



Departamento de Fisiología  
CIMUS, Laboratorio de Biología Vascular y  
Señalización Celular

# Efectos metabólicos de Mst3

Memoria del trabajo de investigación para optar al grado de Doctor

realizado por:

Cristina Iglesias García

dirigida por:

Juan Bautista Zalvide Torrente

y

Celia María Pombo Ramos





Fotografía portada: ***"Happy animals make good science"***, Esther Gómez

Ratones de cepa mixta empleados para este trabajo



O Dr. **JUAN BAUTISTA ZALVIDE TORRENTE**, Catedrático de Universidade, e a Dra. **CELIA MARÍA POMBO RAMOS**, Profesora Titular, ambos do Departamento de Fisioloxía da Universidade de Santiago de Compostela,

Como Directores da Tese de Doutoramento titulada, **«Efectos metabólicos de Mst3»**  
Presentada por **Cristina Iglesias García**, alumna do Programa de Doutoramento en Medicina Molecular,

AUTORIZAN a presentación da tese indicada, considerando que reúne os requisitos esixidos no artigo 34 do regulamento de Estudos de Doutoramento, e que como Directores da mesma non incurre nas causas de abstención establecidas na lei 30/1992.

En Santiago de Compostela, Setembro do 2016

Asdo.: Dr. Juan Zalvide

Asdo.: Dra. Celia Pombo

Asdo.: Cristina Iglesias



*“No importa cuantas piedras encuentres en el camino. Cada decepción supone una ganancia en fortaleza y un empujón para conseguir llegar a la meta. Una vez alcanzada, todas las dificultades quedan relegadas al olvido y sólo permanece el recuerdo de lo bueno, de los amigos que te acompañaron en la lucha y del aprendizaje que no fuiste capaz de apreciar mientras te lamentabas de las caídas”.*

*Anónimo*







*A miñas avoas*



## RESUMEN

La familia de proteínas GCK-III (SOK1, Mst4 y Mst3) son serina/treonina quinasas con funciones conocidas en respuesta a estrés oxidativo, reorganización del citoesqueleto o migración celular. Sin embargo, recientemente ha sido publicada la implicación de SOK1 como regulador negativo del metabolismo lipídico y de la glucosa. Aunque se encontró esto para SOK1, por el momento no se han descrito funciones metabólicas para ninguna de las otras dos quinasas de la familia y por ello, en este trabajo se quiso explorar esa posibilidad, particularmente para Mst3, realizando experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Estudios *in vitro* usando la tecnología shRNA en células HepG2 aportaron resultados preliminares que indicaban que la falta de Mst3 en estas células comprometía la expresión de genes gluconeogénicos como G6PC y PCK1.

Estudios *in vivo* con ratones deficientes para Mst3 confirmaron un papel para esta proteína en la regulación del proceso gluconeogénico. Ratones alimentados con una dieta alta en grasas (HFD, *high fat diet*) presentaban una mayor activación de Mst3 que ratones alimentados con una dieta convencional apuntando a Mst3 con un papel no sólo bajo estrés oxidativo, sino que también bajo un estrés metabólico. El fenotipado metabólico mostró que estos ratones deficientes en Mst3 eran menos resistentes a insulina, presentaban menor hiperglucemia en ayunas y menos esteatosis en hígado después de HFD que ratones normales. Esto era consistente además con unos menores niveles de expresión de G6PC en hígado. Estos efectos parecían muy específicos puesto que otros parámetros como el peso o el porcentaje de masa grasa corporal, gasto energético, actividad locomotora, ingesta... no estaban alterados.

Ahondando en el mecanismo molecular por el cual Mst3 podría mediar estos efectos sobre la regulación de la expresión de G6PC y PCK1, en ausencia de Mst3 se encontraron alteradas dos de las principales vías de control de la gluconeogénesis: la vía de la insulina que mostraba una sobre activación de su eje mTORC2/AKT/FOXO1 y la respuesta a AMP cíclico.

Con estos resultados encontrados para Mst3 y su regulación específica sobre la glucosa y teniendo en cuenta la relevancia de la gluconeogénesis en la Diabetes Mellitus Tipo 2 como principal responsable en estos pacientes de la hiperglucemia en ayunas, en este trabajo proponemos a Mst3 como posible diana terapéutica en el tratamiento de esta patología.

**PALABRAS CLAVE:** GCK-III, Mst3, gluconeogénesis, mTORC2/AKT/FOXO1, AMP cíclico, Diabetes Mellitus Tipo 2.



## RESUMO

A familia de proteínas GCK-III (SOK1, Mst4, e Mst3) son serina/treonina quinasas con funcións recoñecidas na resposta a estrés oxidativo, reorganización do citoesqueleto ou migración celular. Sen embargo, recentemente publicouse a implicación dunha delas, SOK1, como regulador negativo do metabolismo lipídico e da glucosa. Aínda que isto se atopou para SOK1, polo momento non se describiron funcións metabólicas para ningunha das outras dúas quinasas da familia, e por iso neste traballo quixemos explorar esa posibilidade, particularmente para Mst3, realizando experimentos tanto *in vitro* coma *in vivo*.

Estudos *in vitro* empregando a tecnoloxía shRNA en células HepG2 aportaron resultados preliminares que indicaban que a falta de Mst3 nestas células comprometía a expresión dos xenes gluconeoxénicos G6PC e PCK1.

Estudos *in vivo* con ratos deficientes para Mst3 confirmaron un papel para esta proteína na regulación do proceso gluconeoxénico. Ratos alimentados cunha dieta alta en graxa (HFD, *high fat diet*) presentaban unha maior activación de Mst3 ca ratos alimentados con unha dieta convencional apuntando así a Mst3 con un papel non só baixo estrés oxidativo senón que tamén baixo un estrés metabólico. O fenotipado metabólico mostrou que estes ratos deficientes en Mst3 eran menos resistentes a insulina, presentaban menor hiperglicemia en xaxún e unha menor esteatose no fígado despois da HFD ca ratos normais. Isto era consistente ademais con uns niveis de expresión de G6PC menores no fígado. Estes efectos parecían moi específicos posto que outros parámetros coma o peso ou a porcentaxe de masa graxa corporal, gasto enerxético, actividade locomotora, inxesta... non estaban alterados.

Afondando no mecanismo molecular polo cal Mst3 podería exercer os seus efectos sobre a regulación da expresión de G6PC e PCK1, en ausencia de Mst3 atopáronse alteradas dúas das principais vías de control da gluconeoxénese: a vía da insulina, que mostraba unha maior activación do seu eixo mTORC2/AKT/FOXO1 e a resposta a AMP cíclico.

Con estes resultados atopados para Mst3 e a súa regulación específica sobre a glucosa, e tendo en conta a relevancia da gluconeoxénese na Diabetes Mellitus Tipo 2 como principal

responsable nestes pacientes da hiperglicemia en xaxún, neste traballo propoñemos a Mst3 como posible diana terapéutica no tratamento desta patoloxía.

**PALABRAS CHAVE:** GCK-III, Mst3, gluconeoxénese, mTORC2/AKT/FOXO1, AMP cíclico, Diabetes Mellitus Tipo 2.



## ABSTRACT

The GCK-III family of proteins (SOK1, Mst4 and Mst3) are serin/threonin kinases with well-known functions in the response to oxidative stress, cytoskeleton reorganization or cellular migration. Nevertheless, very recently it was published the involvement of one of them, SOK1, as a negative regulator of lipid and glucose metabolism. Although this has been found for SOK1, by the moment no metabolic function has been described for the other two kinases and we wanted to explore this possibility, particularly for Mst3, performing both *in vitro* and *in vivo* experiments.

*In vitro* studies using shRNA technology with HepG2 cell line yielded us some preliminary results indicating that cells lacking Mst3 protein had compromised the expression of gluconeogenic genes like G6PC and PCK1.

*In vivo* studies with Mst3 knockdown mice confirmed a role for Mst3 in the gluconeogenic process. Mice fed with a high fat diet (HFD) showed a higher activation of Mst3 in liver than mice fed with standard diet indicating that this kinase may have a role not only under oxidative stress, but also under metabolic stress. Metabolic phenotyping has shown that Mst3 deficient mice were less insulin resistant, presented lower fasting hyperglycemia and lower liver steatosis than normal mice after a HFD which was consistent with their lower G6PC mRNA expression in liver. These effects seem to be very specific since other metabolic parameters like body weight, body fat composition, energy expenditure, locomotor activity, food intake... were not altered.

Deep looking into the molecular mechanism by which Mst3 could be mediating this regulation of G6PC and PCK1 expression we have found altered two of the main gluconeogenic regulation pathways in the absence of Mst3: the insulin pathway with an over activation of the mTORC2/AKT/FOXO1 axis and the response to cyclic AMP.

With this results for Mst3 and its specific glucose regulation, and having in mind that gluconeogenic pathway is a relevant process in the pathology of Type 2 Diabetes Mellitus mediating the fasting hyperglycemia we propose Mst3 as a good therapeutic target for the treatment of this pathology.

**KEYWORDS:** GCK-III, Mst3, gluconeogenesis, mTORC2/AKT/FOXO1, cyclic AMP, Type II Diabetes,





## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

**AC:** adenilato ciclasa

**ACC:** acetil-CoA carboxilasa

**AGEs:** *Advanced Glycation End products*

**AMPc:** adenosina monofosfato cíclica

**AMPK:** *AMP-activated protein kinase*

**AP-1:** proteína activadora

**ATCC:** *European Collection of Authenticated Cell Cultures*

**ATF16:** *Activating Transcription Factor 6*

**ATMs:** *Adipose Tissue Macrophages*

**ATP:** adenosina trifosfato

**AUC:** *Area Under Curve*

**BSA:** *Bovine Serum Albumin*

**CBP:** *CREB Binding Protein*

**CCM:** *Cerebral Cavernal Malformations*

**CCM3:** *Cerebral Cavernous Malformations 3*

**cDNA:** *complementary deoxyribonucleic acid*

**CDS:** *Coding DNA Sequence*

**CRE:** *cAMP Response Element*

**CREB:** *cAMP Response Element-Binding*

**CRTC2:** *CREB Regulated Transcription Co-activator 2*

**DAGs:** diacilgliceroles

**DEPC:** dietilpirocarbonato

**DM 1,2:** Diabetes Mellitus 1,2

**DMSO:** dimetil sulfóxido

**DTT:** 1,4-Dithiothreitol

**ECACC:** *European Collection of Authenticated Cell Cultures*

**EE:** *Energy Expenditure*

**EGF:** *Endothelial Growth Factor*

**ER:** *Endoplasmic Reticulum*

**ERM:** *Ezrin Radixin Moesin*

**ES:** *Embrionic Stem cells*

**F1,6BPasa:** fructosa 1,6-bifosfatasa

**F2,6BPasa:** fructosa 2,6-bisfosfatasa

**FASN:** *Fatty Acid Synthase*

**FBP1:** *Fructose-bisphosphatase 1*

**FBPasa:** fructosa 1,6-bifosfatasa

**FBS:** *Foetal Bovine Serum*

**FFA:** *Free Fatty Acids*

**FI:** *Food Intake*

**FOXO:** *Forkhead box protein O1*

**FPG:** *Fasting Plasma Glucose*

**G6PC:** *Glucose-6-phosphatase catalytic subunit*

**GCK:** glucoquinasa

**GCK:** *Germinal Center Kinases*

**GDM:** *Gestacional Diabetes Mellitus*

**GDM:** *Gestacional Diabetes Mellitus*

**GT:** *Gene Trap*

**GTT:** *Glucose Tolerance Test*

**HeBS2x:** *HEPES-buffered saline (HeBS) solution, 2x*

**HEK 293:** *Human Embryonic Kidney 293*

**HepG2:** *Human Caucasian hepatocyte carcinoma*

**HFD:** *High Fat Diet*

**HK:** *Housekeeping*

**HK6:** Hexoquinasa 6

**HNF-4 $\alpha$ :** *Hepatocyte Nuclear Factor-4 alpha*

**HPK1:** *Hematopoietic Progenitor Kinase 1*

**IF:** inmunofluorescencia

**IFG:** *Impaired Fasting Glucose*

**IGT:** *Impaired Glucose Tolerance*

**IGTC:** *International Gene Trap Consortium*

**IKK:** I $\kappa$ B quinasa

**IL6:** interleuquina 6

**IP:** Inmunoprecipitación

**IP:** Intraperitoneal

**IR:** *Insulin Receptor*

**IRE:** *Insulin Response Element*

**IRE-1 $\alpha$ :** *Inositol Requiring enzyme 1 alpha*

**IRS1:** *Insulin Receptor Substrate 1*

**ITT:** *Insulin Tolerance Test*

**JNK:** Quinasa Jun-N-terminal

**KD:** *Knockdown*

**KO:** *Knockout*

**LA:** *Lipoic Acid*

**LA:** *Locomotor Activity*

**LB:** *Luria-Broth*

**MAP4K:** *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase*

**MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinases*

**MCP-1:** *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

**MHC-II:** *Major Histocompatibility Complex class II )*

**MODY 1, 2:** *Maturity Onset Diabetes of the Young 1,2*

**MOI:** *Multiplicity of Infection*

**mRNA:** *messenger Ribonucleic Acid*

**Mst3:** *Mammalian Ste20-like kinase 3*

**Mst4:** *Mammalian Ste20-like kinase 4*

**mTORC2:** *Rictor-mTOR Complex 2*

**NAFLD:** *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*

**NASH:** *Nonalcoholic steatohepatitis*

**NDR1,2:** *Nuclear Dbf2 (dumbbell-former 2)-related 1,2*

**NEFAS:** *Non Sterified Fatty Acids*

**NES:** *Nuclear Export Signal*

**NFκB:** *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

**NLS:** *Nuclear Localization Signal*

**nPKCs:** *novel PKCs*

**OGTT:** *Oral Glucose Tolerance Test*

**OMS:** *Organización Mundial de la Salud*

**ON:** *Over Night*

**ONPG:** *2-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside*

**p/v:** *peso/volumen*

**pA:** *PoliAdenilation*

**PAK:** *p21 Activated Kinases*

**PBS:** *Phosphate Buffer Saline*

**PC:** *Piruvato carboxilasa*

**PC1:** *prohormona convertasa 1*

**PDCD10:** *Programmed Cell Death 10*

**PDK-1:** *Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*

**PEPCK:** *Fosfoenol piruvato carboxiquinasa*, **PCK1:** *Fosfoenol piruvato carboxiquinasa en su forma citosólica*

**PERK:** PKR-like ER quinasa

**PFK1:** Fosfofructoquinasa 2

**PFK2/F2,6BPasa:** Fosfofructoquinasa 2/fructosa 2,6-bisfosfatasa, enzima bifuncional

**PGC1 $\alpha$ :** *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

**PH:** *Pleckstrin Homology*

**PHLPP:** *PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase*

**PI3K:** fosfatidilinositol 3-quinasa

**PKA:** Proteína quinasa A dependiente de AMPc

**PKB:** Proteína quinasa B

**PKC:** Proteína quinasa C

**PKN-NGF:** *Protein kinase N-Nerve Growth Factor*

**POMC:** pro-opiomelancortina

**PP2A:** *Protein Phosphatase 2A*

**PPAR $\gamma$ :** *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*

**PRBB:** *Parque de Investigación Biomédica de Barcelona*

**PTEN:** *Protein Phosphatase and Tensin Homolog*

**PTT:** *Pyruvate Tolerance Test*

**qPCR:** *quantitative Polymerase Chain Reaction*

**RB:** *Running Buffer*

**RBP-4:** *Retinol Binding Protein 4*

**RNS:** *Reactive Nitrogen Species*

**ROS:** *Reactive Oxygen Species*

**Rpm:** revoluciones por minuto

**RQ:** *Respiratory Quotient*

**RT:** Reversotranscripción

**RT:** *Room Temperature*

**RTK:** receptores tirosina quinasa

**RT-PCR:** *Reverso Transcription-Polimerase Chain Reaction*

**SA:** *Splicing Acceptor*

**SAPK:** *Stress Activated Protein Kinases*

**SARAH:** *Salvador, RASSF1, Hippo*

**SD:** *Standard Diet*

**SDS:** *Dodecil-sufato sódico*

**SGK1:** *Serum- and Glucocorticoid-induced protein Kinase 1*

**shRNA:** *short hairpin RNA*

**Slc2a1:** *Solute carrier family 2 member 1*

**Slc2a4:** *Solute carrier family 2 member 4*

**SOK1:** *Ste20-like/Oxidant-stress-response Kinase 1*

**STRIPAK:** *Striatin-Interacting Phosphatase And Kinase*

**TB:** *Transfer Buffer*

**TCF7L2:** *Transcription Factor 7-like 2*

**TE:** *Tris-EDTA*

**TG:** *Triglicéridos*

**Tm:** *Melting Temperature*

**TNF- $\alpha$ :** *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*

**TRAF2:** *TNF Receptor Associated Factor 2*

**UCP3:** *Proteína desacoplante 3*

**UPR:** *Unfolded Protein Response*

**v/v:** *volumen/volumen*

**VLDLs:** *Very Low Density Lipoproteins*

**WB:** *Western Blot*

**WT:** *Wild Type*

**YSK1:** *Yeast Sps1/Ste20-related Kinase 1*

## ÍNDICE

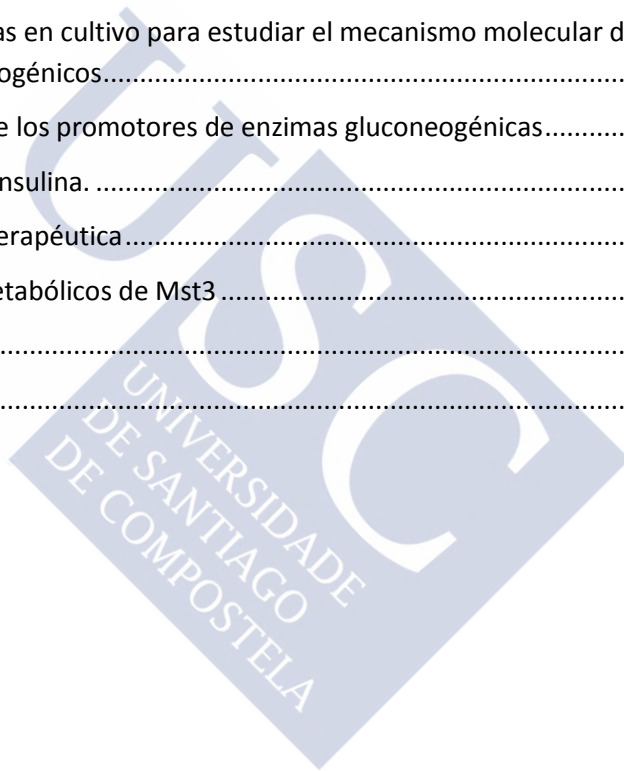
INTRODUCCIÓN.....	27
1. MST QUINASAS.....	29
1.1. Ste20p de mamíferos .....	29
1.2. <i>Mammalian Ste20 like Kinases</i> (Msts): subfamilias GCK-II y GCK-III.....	32
2. DIABETES MELLITUS .....	46
2.1. Descripción.....	46
2.2. Clasificación.....	46
2.3. Epidemiología.....	48
2.4. Diagnóstico.....	49
2.5. IFG e IGT .....	50
2.6. Etiopatogenia DM1 y DM2 .....	51
3. DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2).....	53
3.1. Obesidad, factor de riesgo para la DM2.....	53
3.2. Resistencia a insulina y secreción anormal de insulina.....	54
3.3. Metabolismo anormal de las grasas y otros mecanismos moleculares que conducen a resistencia a insulina .....	55
3.4. Producción excesiva de glucosa en hígado, gluconeogénesis.....	63
4. METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN AYUNAS .....	65
4.1. Glucólisis y gluconeogénesis .....	65
4.2. Regulación de la gluconeogénesis.....	66
4.3. El enzima AKT y la regulación de la gluconeogénesis .....	70
5. EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL PAPEL DE LAS QUINASAS DE ESTRÉS COMO HIPÓTESIS UNIFICADORA PARA EXPLICAR LA RESISTENCIA A INSULINA Y LA DM2 .....	73
5.1. Estrés oxidativo .....	73
5.2. Vías activadas por estrés oxidativo y quinasas de estrés.....	75
OBJETIVOS .....	81
MATERIALY MÉTODOS.....	85
1. CULTIVOS CELULARES.....	87
2. TRATAMIENTOS CELULARES y FÁRMACOS .....	88
3. INFECCIONES LENTIVIRALES .....	88

4.	TRANSFECCIONES TRANSITORIAS.....	90
4.1.	Tranfección mediante Lipofectamina 2000.....	90
4.2.	Transfección mediante el método de precipitación con fosfato cálcico.....	91
5.	AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS .....	93
5.1.	Cultivo bacteriano .....	93
5.2.	Obtención del DNA plasmídico.....	93
5.3.	Cuantificación de la concentración del DNA plasmídico .....	94
5.4.	Digestión con enzimas de restricción .....	94
6.	INMUNOFLUORESCENCIAS.....	94
6.1.	Procedimiento para la fijación, tinción y montaje de las células .....	94
6.2.	Obtención de imágenes mediante microscopía .....	95
7.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	96
7.1.	Genotipado de los ratones transgénicos.....	97
7.2.	Estabulación.....	101
7.3.	Diseño experimental.....	102
7.4.	Fenotipado metabólico.....	103
7.5.	Determinación de la composición corporal.....	104
7.6.	Test de tolerancia a glucosa, insulina y piruvato.....	105
7.7.	Sacrificio y recogida de tejidos y muestras.....	105
7.8.	Determinaciones en muestras de ratones .....	105
8.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL.....	107
8.1.	Obtención de lisados de hígado para extracción de RNA .....	108
8.2.	Obtención de extractos celulares para extracción de RNA .....	108
8.3.	Aislamiento del RNA .....	108
8.4.	Retrotranscripción .....	109
8.5.	PCR tiempo real (qPCR) .....	109
9.	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS.....	112
9.1.	Extracción de proteína a partir de lisados de hígado .....	112
9.2.	Extracción de proteína en cultivo celular .....	112
10.	CUANTIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS, MÉTODO DE BRADFORD .....	113
11.	ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT .....	114
11.1.	Preparación de las muestras para electroforesis en SDS-PAGE .....	114
11.2.	Electroforesis en SDS-PAGE .....	114



11.3. Transferencia semi-seca.....	115
11.4. Inmunodetección .....	116
12. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS MÚLTIPLES .....	119
13. INMUNOPRECIPITACIÓN .....	121
14. AISLAMIENTO DE BALSAS LIPÍDICAS ( <i>LIPID RAFTS</i> ) .....	122
15. ANALISIS ESTADÍSTICO .....	124
RESULTADOS.....	125
1. PUESTA A PUNTO DEL MODELO CELULAR .....	127
2. LA EXPRESIÓN DE GENES GLUCONEOGENICOS ESTÁ AFECTADA POR EL SILENCIAMIENTO DE MST3 .....	129
3. PUESTA A PUNTO DEL MODELO ANIMAL. ....	130
4. EFECTO DE LA FALTA DE Mst3 SOBRE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA EN RATONES .....	141
4.1. Los ratones deficientes para Mst3 de 2 meses de edad y alimentados con una dieta convencional no presentan alteraciones metabólicas.....	141
4.2. La dieta alta en grasa (HFD) desencadena la activación de las quinasas GCK-III .....	149
4.3. Los ratones KD para Mst3 alimentados con una dieta HFD están protegidos de la hiperglucemia en ayunas y la resistencia a insulina.....	150
4.4. Los ratones deficientes para Mst3 alimentados con una dieta HFD presentan menos triglicéridos en hígado.....	163
4.5. Los ratones deficientes para Mst3 alimentados con una dieta alta en grasas tienen menor cantidad de glucógeno hepático .....	164
5. ESTUDIO A NIVEL MOLECULAR DEL EFECTO DE LA FALTA DE MST3 SOBRE LA REGULACIÓN DE LA GLUCONEOGENESIS .....	165
5.1. La actividad del promotor de G6PC se regula por la presencia de Mst3 .....	165
5.2. El silenciamiento de Mst3 no afecta a la vida media de G6PC .....	167
5.3. El silenciamiento de Mst3 afecta a la vía de respuesta a insulina aumentando la fosforilación de AKT y su sustrato FOXO1 así como la actividad de mTORC2 .....	168
5.4. El silenciamiento de Mst3 no afecta a otras vías metabólicas importantes o a determinadas vías MAPK .....	172
5.5. Ratones KD Mst3 tienen aumentada la fosforilación de AKT y NDRG1 .....	174
5.6. La regulación de Mst3 sobre genes gluconeogénicos se produce cuando los niveles de insulina son bajos .....	175
5.7. En ausencia de Mst3 se produce una menor entrada de FOXO1 al núcleo para promover la expresión de genes gluconeogénico .....	176
5.8. El efecto de Mst3 sobre la vía de insulina depende de PI3K.....	178

5.9. En ausencia de Mst3 se produce menor entrada de FOXO1 tras la inhibición de PI3K ..	180
5.10. Mst3 es importante no sólo para la regulación de genes gluconeogénicos con bajos niveles de insulina sino también en respuesta a AMPc. ....	182
5.11. No se detecta interacción endógena y en sobreexpresión entre AKT y Mst3 .....	185
DISCUSIÓN.....	189
1. Utilización del modelo animal <i>Knockdown</i> (KD) de Mst3.....	192
2. Activación de Mst3 con estrés metabólico.....	194
3. La acción de Mst3 es específica sobre la regulación de glucemia en ayunas .....	195
4. Mst3 regula la gluconeogénesis .....	197
5. La deficiencia en Mst3 protege frente a la resistencia a insulina .....	198
6. Modelo de células hepáticas en cultivo para estudiar el mecanismo molecular de regulación de Mst3 sobre enzimas gluconeogénicos.....	199
7. Mst3 regula la expresión de los promotores de enzimas gluconeogénicas.....	200
8. Mst3 regula la vía de AKT/insulina. ....	201
9. Mst3 como posible diana terapéutica.....	204
10. Resumen de los efectos metabólicos de Mst3 .....	205
CONCLUSIONES.....	207
BIBLIOGRAFÍA .....	211



# INTRODUCCIÓN





## 1. MST QUINASAS

### 1.1. Ste20p de mamíferos

A principios de los 90 se describió por primera vez la Ste20p (*sterile 20 protein*), una serina/treonina quinasa clave en la vía de apareamiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Leberer, Dignard et al. 1992). Poco después, los grupos de Lim y Jhon Kehrl identificaron en mamíferos proteínas con una elevada homología a la Ste20p de la levadura y las llamaron proteínas Ste20-like. Se identificaron alrededor de 30 de estas quinasas en mamíferos y se agruparon en 2 familias estructuralmente distintas que se denominan **PAK** (**p21 Activated kinases**) y **GCK** (**Germinal Center Kinases**) (Katz, Whalen et al. 1994, Manser, Leung et al. 1994).

- **PAKs.** A su vez la familia PAK se subdivide en PAK-I y PAK-II. Las PAKs se caracterizan por dos rasgos estructurales: un dominio quinasa en el extremo C-terminal y un dominio de unión a pequeñas GTPasas como Cdc42/Rac-1 (CRIB) en el medio del extremo no catalítico N-terminal. En la subfamilia PAK-I es característico su dominio auto inhibitorio que interacciona con el dominio quinasa para mantenerlo inactivo. Bajo la unión de Cdc42 o Rac-1 esta interacción se inhibe y permite la activación de la quinasa. Otra característica de la familia PAK-I es un motivo rico en prolinas en el extremo N-terminal que sirve como lugar de unión para el dominio SH3 (*Src-homology 3*) de proteínas adaptadoras. En cambio, la subfamilia PAK-II tiene un dominio CRIB sin un dominio autoinhibitorio reconocible. Las PAKs tienen funciones bien definidas en cuanto a regulación de la migración celular, crecimiento celular y apoptosis. Se pueden detectar alteraciones en la expresión de PAKs en algunos tipos de cáncer humano, lo que las hace unas dianas atractivas para el tratamiento del mismo (figura 1). Sin embargo, no parecen tener relación con alteraciones metabólicas, por lo que no se mencionarán más en este trabajo (Bagrodia and Cerione 1999).

- **GCKs.** Las GCKs se subdividen en 8 familias desde GCK-I a GCK-VIII y al contrario que las PAKs se caracterizan por la presencia de su dominio quinasa en el extremo N-terminal y la falta de dominios de unión a GTPasas. Su dominio no catalítico es el que presenta una mayor variabilidad de estructuras. Así, por ejemplo, la subfamilia GCK-II contiene un dominio

autoinhibitorio y un dominio de dimerización y la familia de las GCK-III tiene una región C-terminal muy estrecha y poco conservada. Las GCKs se ven involucradas en múltiples procesos fisiológicos como la regulación del volumen celular y respuesta inmunitaria. En este trabajo, nos centraremos en describir detalladamente las funciones de la subfamilia de las GCKIII donde se incluye la proteína objeto de estudio (Dan, Watanabe et al. 2001) (figura 1).

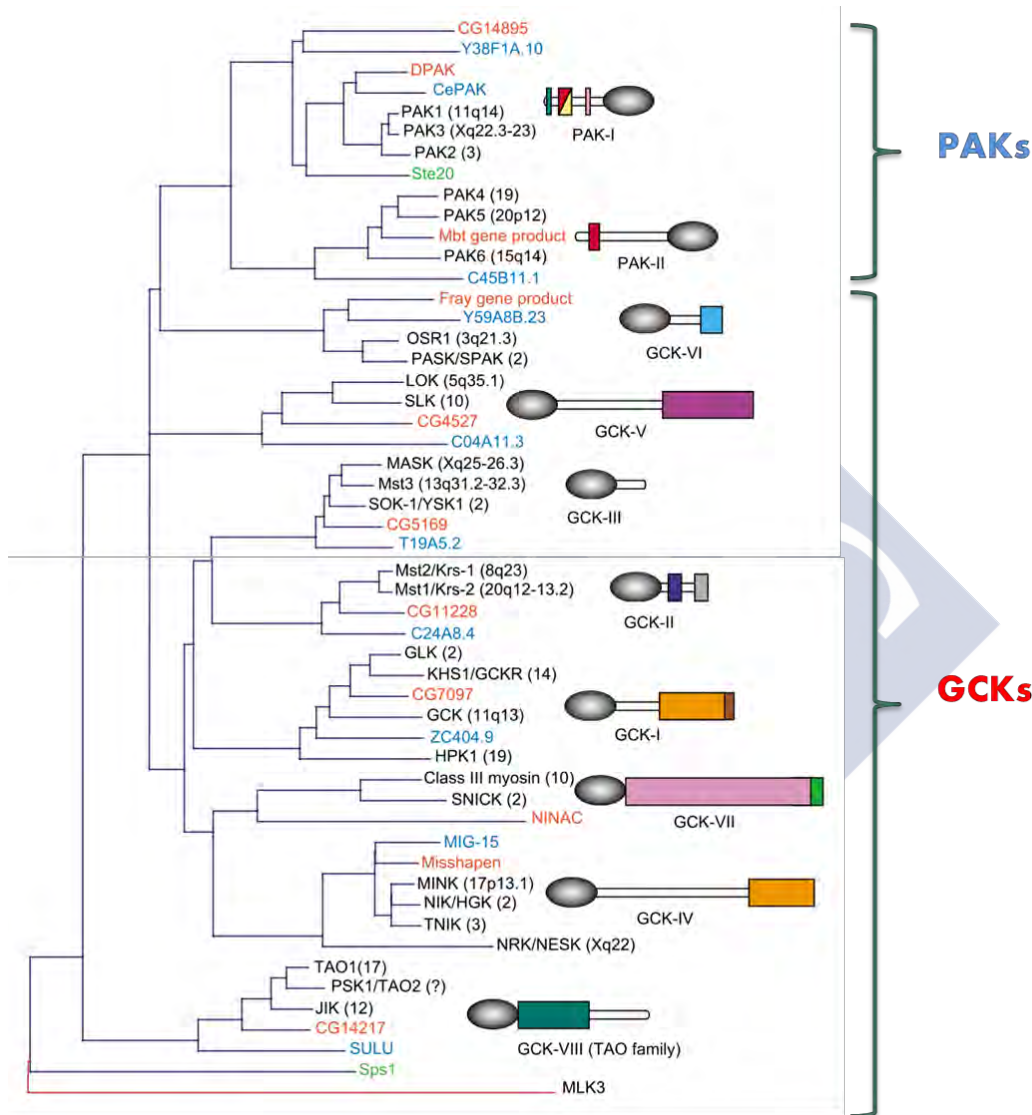


FIGURA 1. Relaciones filogenéticas entre el grupo de quinasas Ste20 de mamíferos y esquema de su estructura en cada subfamilia. Se muestra la estructura esquemática de cada subfamilia: los óvalos negros representan los dominios quinasa, los rectángulos con diferentes colores indican los dominios conservados y las barras blancas indican las regiones variables. Las PAK consisten en dos subfamilias PAK-I y PAK-II y las GCK constan de 8 subfamilias que abarcan desde GCK-I a GCKV-III todas ellas con distintas características (Dan, Watanabe et al. 2001).

### 1.1.1. Funciones de las Ste20p en las cascadas MAP quinasa

La proteína **Ste20p** se describió originalmente como una quinasa clave en la vía de apareamiento de la levadura de cerveza haploide *Saccharomyces cerevisiae*. Esta vía se inicia por la unión de una feromona peptídica a un receptor de feromonas que a su vez activa la subunidad beta-gamma de una proteína G heterotrimérica y desencadena la transmisión de señales a través de la ruta de las proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPK, *Mitogen Activated Protein Kinases*) según la siguiente secuencia: primero se activa Ste11p (MAP3K), seguidamente Ste7p (MAP2K) y por último Fus3p y Kss1p (MAPKs). La fosforilación directa de Ste11p por Ste20p la activa y se ha considerado como un paso crucial en esta vía de señalización, apuntando a Ste20p como una posible MAP4K (Wu, Whiteway et al. 1995). Sin embargo, no se ha llegado a incluir en el módulo conservado de la señalización MAPK sino que se ha considerado más bien como un activador *upstream*.

Basándose en la similitud de secuencia con la Ste20p de levaduras, sería lógico pensar que las Ste20p de mamíferos podrían actuar como MAP4K y directamente fosforilar y activar a las MAP3K, conduciendo a la activación de la cascada MAPK. Así ha sido demostrado para el caso de la Ste20p de mamíferos denominada quinasa del progenitor hematopoyético (HPK1, *Hematopoietic Progenitor Kinase 1*) que pertenece a la subfamilia GCK-I y fosforila directamente a la MAPK quinasa quinasa 1 (MEKK1) desencadenando la activación de SAPK/JNK. También para PAK2 que pertenece a la subfamilia PAK-I se ha encontrado actividad para fosforilar directamente a la MAP3K Raf-1. No obstante, para otros miembros de las Ste20p de mamíferos no se ha demostrado su capacidad para modular o activar a las MAP3K mediante fosforilación sino simplemente por unión, y eso sólo para algunas, por ello hasta el momento no se les ha definido como MAP4Ks propiamente y se les ha considerado más bien como estabilizadoras de las estructuras activadas de MAP3K. Otro aspecto destacable es que TAO1 y PSK1/TAO2 pertenecientes a la subfamilia de GCK-VIII pueden actuar como MAP3Ks para conducir a la activación de p38 MAPK (Dan, Watanabe et al. 2001, Pombo, Force et al. 2007). En el caso de la subfamilia de las GCK-III (Mst3, Mst4 y SOK1) se han detallado numerosas funciones en las que actúan como activadoras de las vías MAPK y concretamente Mst3 se ha descrito como mediadora de la muerte celular inducida por



estrés oxidativo a través de la modulación que ejerce sobre la activación de JNK (Chen, Ng et al. 2009). Más adelante en la tabla 1 se concretará más acerca del papel de las GCK-III en las vías MAPK.

### 1.1.2. Otras funciones de las Ste20p de mamíferos

Algunas Ste20p de mamíferos son necesarias en eventos de señalización que incluyen la apoptosis, la morfogénesis y la reorganización del citoesqueleto (incluyendo movilidad celular y cambios de la morfología celular) organización del Golgi y supervivencia celular. En concreto, Mst4 interaccionando con CCM3/PDCD10 (*Cerebral Cavernal Malformation 3*)/(*Programmed Cell Death 10*) y proteínas ERM (*Ezrin-Radixin-Moesin*) puede promover la supervivencia bajo condiciones de estrés oxidativo (Fidalgo, Guerrero et al. 2012). Las implicadas en la inducción o prevención de la apoptosis lo pueden hacer ya sea a través de la activación de vías de señalización MAPK o regulando eventos celulares que ocurren durante este proceso. Por ejemplo, en la apoptosis desencadenada por la unión del ligando Fas a su receptor se inducen una serie de cortes secuenciales de caspasas hasta llegar a activar a las caspasas efectoras que activan a las Ste20. Una de las caspasas efectoras, la caspasa 3, corta a las quinasas Mst1, Mst2, HPK1, SLK y PAK2. Se ha visto que la sobreexpresión de Mst1 en células desencadena la activación de la caspasa 3 y así esta puede ejecutar un corte de Mst1 que libera el extremo C-terminal regulador y genera un Mst1 truncado de mayor actividad capaz de inducir apoptosis (Graves, Gotoh et al. 1998).

### 1.2. Mammalian Ste20 like Kinases (Msts): subfamilias GCK-II y GCK-III

Bajo el acrónimo Msts se incluyen 5 quinasas pertenecientes a las subfamilias GCK-II y GCK-III del grupo de las Ste20 de mamíferos. La subfamilia GCK-II comprende a **Mst1** (STK4) y **Mst2** (STK3) de *Homo sapiens* y otros vertebrados. Existen ortólogos en otros organismos que incluyen a Hippo en *Drosophila melanogaster* y C24A8.4 de *Caenorhabditis elegans*. Los miembros de la subfamilia GCK-III en vertebrados son, **Mst3** (STK24), **Mst4** (STK26 o MASK (*Mst3 and SOK1-related kinase*)) y **SOK1** (también llamada STK25 o YSK1). Un posible ortólogo en *D. melanogaster* es STLK3 y GCK-I en *C. elegans*. Estas quinasas son cada vez más estudiadas por ser moléculas claves en la señalización de procesos como la proliferación celular, tamaño celular, migración y polaridad celular y estar implicadas en procesos



patológicos que van desde cáncer, pasando por malformaciones cavernosas cerebrales, hasta enfermedades autoinmunes (Sugden, McGuffin et al. 2013, Thompson and Sahai 2015).

### 1.2.1. Expresión

La expresión de mRNA de estas quinasas Mst1-4 es generalmente ubicua en la mayoría de tejidos y células examinadas. Mediante *Northern Blot* se detecta un transcripto de 7,0-kb de Mst1 en la mayoría de tejidos y un mRNA de 3,5-kb procesado mediante *splicing* se detecta en riñones, músculo esquelético y placenta. Los mayores niveles de un transcripto de 5,5-kb de Mst2 aparecen en riñón de adulto, músculo esquelético y placenta. En cuanto a los genes de las GCK-III, constan de 12 exones que se expresan ubicuamente. SOK1 fue la primera en ser clonada y el análisis por *Northern Blot* muestra un transcripto de 2,2-2,3-kb que se expresa mayoritariamente en testículos y en menores cantidades en otros tejidos. Otros transcriptos de 2,6-1,5-kb de SOK1 se detectan en estómago. El mRNA de Mst3 de una longitud de 2-kb se detecta por *Northern Blot* en corazón, músculo esquelético y páncreas y mediante *Western Blot* se detecta una proteína Mst3 de 52-kD en la mayoría de células analizadas. Mst3 presenta una isoforma denominada Mst3b cuya secuencia es idéntica a Mst3 excepto por una región codificante adicional en el extremo 5' de su cDNA. La expresión de Mst3b se restringe al cerebro, particularmente en el hipocampo, en contraste con la expresión ubicua de Mst3. Aunque sus funciones no están bien definidas todavía, Mst3b podría resultar clave para el crecimiento axonal y algunos autores se aventuran a apuntar que podría tratarse de la conocida proteína quinasa del factor de crecimiento del nervio (PKN-NGF, *Protein kinase N-Nerve Growth Factor*). Una de las evidencias para corroborar esta hipótesis podría ser que PKN-NGF, al igual que Mst3, puede usar el  $Mn^{2+}$  como cofactor en las reacciones quinasas además del  $Mg^{2+}$  que es el metal iónico cofactor más común. Hasta cuatro iones  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  activan Mst3 exógeno o endógeno en un rango fisiológico. Dado que el  $Mn^{2+}$  es muy abundante en el tejido cerebral y el  $Zn^{2+}$  es importante para mantener la función de este tejido, Mst3 puede tener cierta relevancia en él. Para Mst4 se detecta también por *Northern Blot* una banda de 3,6-kb en todos los tejidos, aunque la mayor expresión se encuentra en placenta y en tejidos del sistema inmune (bazo y timo), seguido de próstata. Además, Mst4 presenta dos variantes de *splicing* (2 y 3) que carecen de

parte de su dominio quinasa y se han considerado como dominantes negativos de Mst4 *in vivo* (Ling, Lu et al. 2008, Sugden, McGuffin et al. 2013).

### 1.2.2. Estructura

Como otros miembros de las subfamilias GCK, los miembros GCK-II y GCK-III tienen un dominio quinasa N-terminal y un dominio regulador C-terminal.

Las **GCK-II (Mst1 y Mst2)** tienen un dominio quinasa prácticamente idéntico entre sí mientras que sólo muestran el 60% de homología en el dominio regulador. En este dominio regulador presentan un par de señales de localización nuclear (NLS, *Nuclear Localization Signal*), una señal de exportación nuclear (NES, *Nuclear Export Signal*) y presenta un dominio de homodimerización SARAH (Salvador, RASSF1, Hippo) consistente en 56 aminoácidos con estructura  $\alpha$ -hélice en el extremo C-terminal (figura 2).

En cuanto a las **GCK-III (Mst3, Mst4 y SOK1)** se describe su estructura detalladamente:

- **Su región N-terminal** comienza con una pequeña secuencia variable seguida por una secuencia muy conservada de 279 residuos de los cuales 251 se corresponden al dominio catalítico o quinasa. Este dominio quinasa se subdivide en 11 subdominios conservados en todas las proteínas serina/treonina quinastas. De los 11 subdominios que presenta el dominio catalítico N-terminal, el I y el II presentan un sitio de unión a ATP, el VIB presenta la secuencia que constituye el bucle T de activación que es el que resulta fosforilado durante la activación de la quinasa (Thr<sup>178</sup> en Mst3 y Mst4, Thr<sup>190</sup> en Mst3b y Thr<sup>174</sup> en SOK1) y el subdominio VIII contiene una secuencia conservada GTP(Y/F/C)WMAPE, denominada “secuencia firma Ste20” que constituye el motivo responsable de la unión de las proteínas sustrato (Sugden, McGuffin et al. 2013).
- **Su región C-terminal** presenta menor longitud que en el resto de las Ste20 y en ella recae el dominio regulador variable, aunque sus 23 residuos N-terminales se encuentran bien conservados y constituyen la región NLS. Esta región conservada se continúa con una región muy variable (134 residuos en Mst3 y Mst3b, 133 residuos en SOK1 y 119 residuos en Mst4) que se ha considerado una región altamente desordenada en la que también aparece una NES. De hecho, aunque Mst3 y Mst4 comparten hasta un 90% de su secuencia aminoacídica, presentan menos del 20% de identidad compartida en la

región C-terminal y esta diferencia podría explicar el hecho de que presenten funciones opuestas en cuanto a crecimiento celular y hacer responsable así al dominio no quinasa o regulador de la función última de estas dos quinasas. Dentro de ese desorden, el dominio C-terminal regulador de las GCK-III muestra similitud con el dominio N-terminal de homodimerización de una proteína altamente conservada de 212 residuos denominada CCM3/PDCD10 permitiendo que se forme un heterodímero, que se ha descrito como estructura cristalográfica para CCM3/PDCD10 y Mst4 (Pombo, Force et al. 2007, Sugden, McGuffin et al. 2013) (figura 2). Más adelante se detallará la estructura de este tipo de heterodímeros con CCM3.

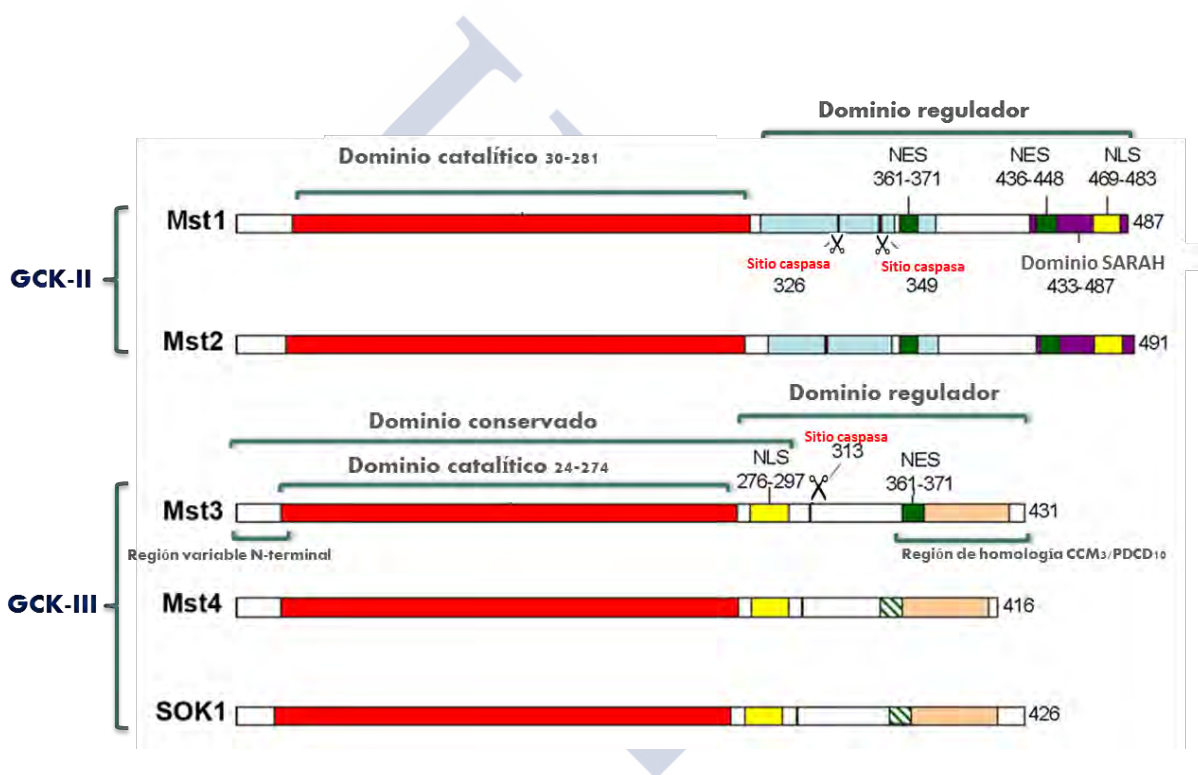


FIGURA 2. Estructura de las GCK-II y GCK-III de las proteínas Ste20 de mamíferos. El nombre y la localización de los rasgos más destacados se indican en Mst1 y Mst3 por ser las más estudiadas y mejor conocidas de cada subfamilia. Adaptado de (Pombo, Force et al. 2007).

### 1.2.3. Mecanismos de activación de las Msts

Los mecanismos principales de activación de estas quinasas se pueden resumir en tres: corte por caspasas, unión a otras proteínas reguladoras, y fosforilación (puede ser autofosforilación) y pueden darse por sí solos o en combinación. La localización de estas quinasas dentro de la célula también es un factor condicionante de su función (Radu and Chernoff 2009).

**A. Corte por caspasas:** las caspasas pueden cortar a las quinasas GCK-III liberando su extremo C-terminal regulador y dejando un fragmento con el extremo N-terminal catalítico que puede llegar a ser hasta diez veces más activo que la enzima parental. Además, con este corte pueden eliminarse secuencias de exclusión nuclear del extremo C-terminal lo que permite la translocación del dominio N-terminal al núcleo para llevar a cabo la fosforilación de distintos sustratos y así modificar la expresión génica (Radu and Chernoff 2009) (figura 3). Por ejemplo, nuestro grupo ha descrito cómo SOK1 se transloca desde el Golgi al núcleo después de anoxia química y esta translocación es dependiente de la actividad de caspasas y de los aminoácidos 275-292 en el extremo C-terminal del dominio quinasa donde reside su secuencia de localización nuclear (NLS) (Nogueira, Fidalgo et al. 2008).

**B. Fosforilación, autofosforilación, inhibición por fosfatasas:** bajo ciertos estímulos apoptóticos o de estrés como radiación UV, TNF- $\alpha$ , serodeprivación, choque térmico, peróxido de hidrógeno, ROS y varios anticancerígenos, las Msts se autofosforilan en múltiples sitios incluyendo residuos treonina del bucle de activación, lo que resulta clave para su activación ya que el bucle cambia su conformación espacial y el sitio activo quinasa queda expuesto. También pueden regularse negativamente por fosforilación como es el caso de Mst1, la cual bajo la acción de factor de crecimiento epitelial (EGF, *Endothelial Growth Factor*) disminuye su actividad quinasa (Radu and Chernoff 2009). Además, la fosforilación de estas quinasas también puede condicionar su sensibilidad a otros mecanismos como el corte por caspasas. Más que requerir la intervención de una quinasa *upstream*, parece más probable que la subfamilia de las GCK-III se active por autofosforilación constitutiva de su bucle T en residuo treonina, aunque también podrían autofosforilarse en sitios adicionales sin evidencias de que dichos sitios afecten en gran medida a su actividad. Parece que la

capacidad que tienen estas quinasas para homodimerizar favorece la *trans*-autofosforilación (Ling, Lu et al. 2008). También es probable que su regulación venga dada por la inhibición de **fosfatasa**s que catalicen su defosforilación o por prevención de la interacción/unión de las GCK-III con dichas fosfatasa. La fosfatasa candidata para la defosforilación de las GCK-III es proteína fosfatasa 2A (PP2A, *Protein Phosphatase 2A*) ya que se ha comprobado que inhibidores de esta como pueden ser el ácido okadaico o la caliculina A desencadenan la activación de Mst3 sin actuar como sus agonistas (Sugden, McGuffin et al. 2013) (figura 3).

**C. Dimerización, asociación a otras proteínas reguladoras:** estas quinasas pueden unirse entre sí formando homodímeros a través de un dominio SARAH o heterodímeros con otras proteínas que también contengan este dominio o con otras proteínas con funciones relacionadas como se ha descrito para Mst1 (Kyriakis 1999, Hwang, Ryu et al. 2007). Las GCK-III (SOK1, Mst4 y Mst3) forman parte junto con CCM3/PDCD10 de un complejo proteico denominado STRIPAK (*Striatin-Interacting Phosphatase And Kinase*) (Kean, Ceccarelli et al. 2011). Además, las GCK-III pueden interaccionar de forma indirecta con las estriatinas que son componentes fundamentales del STRIPAK (figura 4). En este complejo se encuentra además de otros componentes, la fosfatasa PP2A que se encarga de restringir la autofosforilación y la actividad catalítica de las GCK-III, actuando así el STRIPAK como un regulador negativo de las mismas. Además se ha encontrado que la región N-terminal de CCM3 interacciona directamente con el C-terminal de las GCK-III, heterodimerización que se ha propuesto como importante para mantener la integridad vascular en la patología de las malformaciones cavernosas cerebrales (CCM, *Cerebral Cavernal Malformations*) (Ceccarelli, Laister et al. 2011). Parece que la relevancia funcional de la dimerización radica en que favorece la localización citoplasmática de la proteína y en el caso de la interacción entre CCM3/GCK-III ayuda al ensamblaje del Golgi y a la orientación celular (Fidalgo, Fraile et al. 2010). La unión entre sí o a otras proteínas puede condicionar a otros mecanismos de activación. Por ejemplo, la autofosforilación de SOK1 se dispara con la unión de la proteína de matriz del Golgi GM130.

**D. Distribución celular:** la localización de estas proteínas dentro de la célula parece ser un importante determinante para las funciones biológicas que desempeñan y depende

también de la estructura que tengan en esa localización. Como se mencionaba, la dimerización parece conducir a la retención del complejo en el citoplasma, mientras que el corte por caspasas suele relacionarse con el transporte de la proteína cortada al núcleo. Algunas de ellas presentan secuencias NES en su dominio C-terminal que al ser escindido del N-terminal mediante corte por caspasas permite su translocación al núcleo. De la misma forma, existen secuencias NLS que permanecen ocultas en el estado inactivo de la quinasa y se exponen cuando se activa (Pombo, Force et al. 2007) (figura 3).

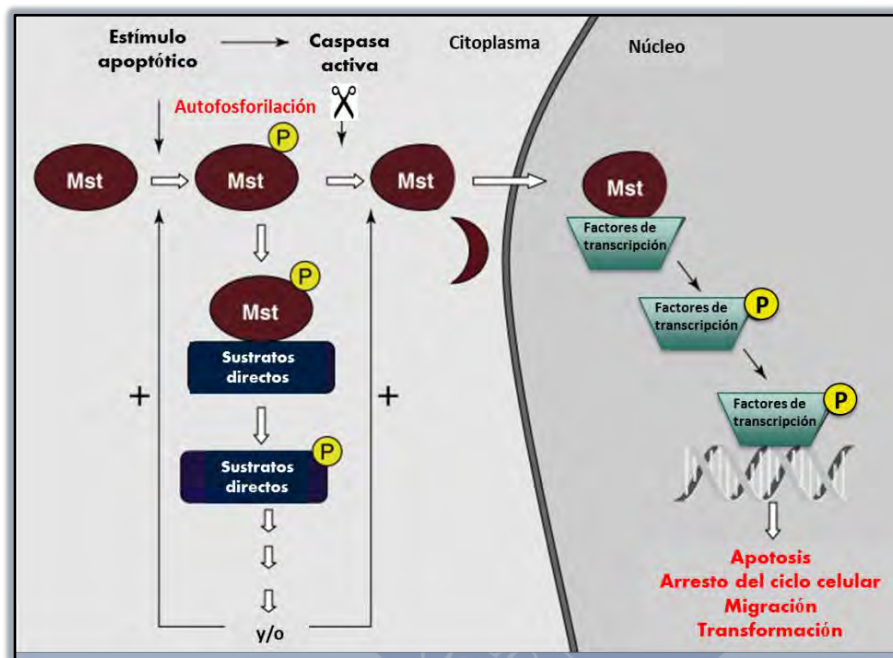


FIGURA 3. Las señales apoptóticas conducen a la activación de las Mst mediante fosforilación y corte proteolítico. (Vía canónica de activación de las Msts). Un estímulo apoptótico lleva a la autofosforilación de las Mst y activación de caspasas. La Mst autofosforilada está activa y fosforila sustratos que amplifican la señal apoptótica, aumentando aún más la actividad caspasa. Además, las caspasas activas cortan el extremo C-terminal regulador liberando el dominio quinasa N-terminal activo lo que permite su translocación al núcleo donde fosforila factores de transcripción e histonas. Adaptado de (Radu and Chernoff 2009).



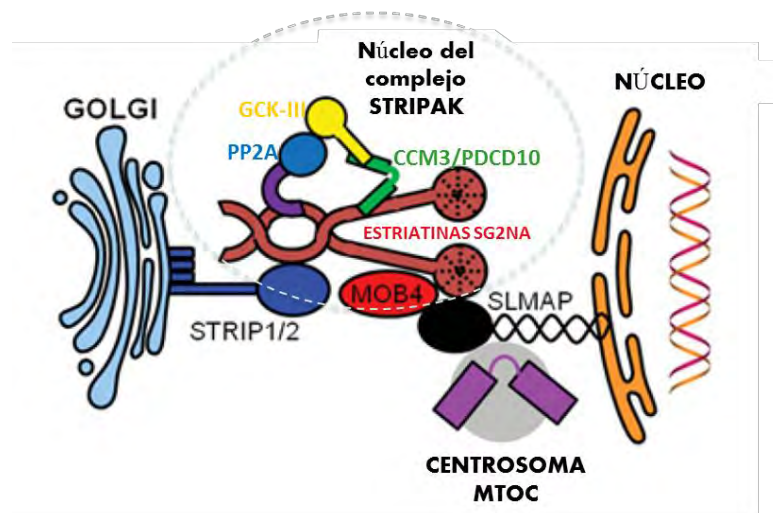
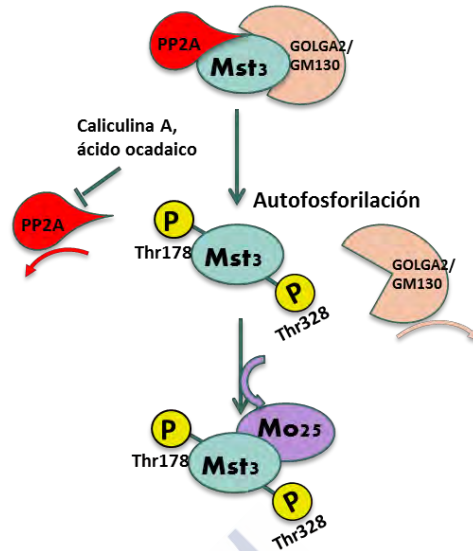


FIGURA 4. Interacción del núcleo del complejo STRIPAK con el aparato de Golgi, el centrosoma o MTOC, y la membrana nuclear. El núcleo del complejo STRIPAK se compone de: estriatinas, PP2A, CCM3/PDCD10 y GCK-III. Adaptado de (Sugden, McGuffin et al. 2013).

#### 1.2.4. Ejemplo de activación de una Mst: Mst3

A continuación se describe el proceso de activación de Mst3 ya que es una de las GCK-III más estudiadas desde el punto de vista de su fosforilación y además es la proteína central objeto de estudio de este proyecto de tesis. Mst3, como SOK1, es capaz de autofosforilarse *in vitro* y lo hace en el residuo treonina del bucle de activación (Thr<sup>178</sup>). La mutación de este residuo a una alanina impide la fosforilación de Mst3. La autofosforilación de Mst3 en este residuo conduce a su activación mediante corte por caspasas en la denominada **vía canónica**. No obstante, Mst3 puede fosforilarse en Thr<sup>182</sup> y en Thr<sup>328</sup>. Este último parece contribuir a la activación de Mst3 favoreciendo su interacción con otras proteínas como MO25 en lo que Fuller y colaboradores denominaron como “**vía no canónica** de regulación de Mst3” (Fuller, McGuffin et al. 2012) (figura 5). Estos sitios adicionales de fosforilación contribuyen en mayor o menor medida a la función de Mst3 pero no constituyen un condicionante para su activación como es el caso de la fosforilación en el bucle de activación Thr<sup>178</sup>. La vía no canónica de Mst3 podría ser aplicable también a otros miembros de la subfamilia GCK-III e incluso de la familia GCKVI, aunque todavía faltan estudios que lo confirmen (Sugden, McGuffin et al. 2013).



**FIGURA 5. Vía “no canónica” de activación de Mst3.** Esta vía regula la actividad de Mst3 por defosforilación. En su estado basal, Mst3 se mantiene inactiva por acción de la fosfatasa PP2A y por unión a la proteína del Golgi (GOLGA2/GM130). Inhibidores de PP2A/PP1 como caliculina A o ácido okadaico estimulan la autofosforilación de Mst3 en el bucle T de activación del dominio catalítico Thr<sup>178</sup> y la autofosforilación simultánea en el residuo Thr<sup>328</sup> del dominio regulador. Mst3 fosforilado en Thr<sup>178</sup>-Thr<sup>328</sup> puede disociarse de GOLGA2/GM130 y así asociarse con MO25. Mientras la fosforilación de Thr<sup>178</sup> resulta clave para la actividad quinasa de Mst3, la fosforilación de Thr<sup>328</sup> parece necesaria para la formación del holocomplejo activo Mst3-MO25. Adaptado de (Fuller, McGuffin et al. 2012, Sugden, McGuffin et al. 2013).

### 1.2.5. Sustratos y funciones de las Msts: GCK-III

Además de su capacidad para autofosforilarse, las GCK-III tienen capacidad de fosforilar a otras proteínas que constituyen sus sustratos. Aunque todas ellas son similares en su dominio N-terminal quinasa, su C-terminal regulador es variable lo que podría ser clave en su preferencia por un determinado sustrato. Ya se mencionó anteriormente para el grupo completo de las Ste20p de mamíferos su capacidad para actuar como MAP4K en la activación o desencadenamiento de vía de señalización MAPK aunque la actuación concreta de las GCK-III como MAP4K es discutida y necesita de más estudios puesto que algunos de ellos han situado a las MAPK incluso por encima de Mst3. En la tabla 1 se detallan los resultados descritos en la literatura para la implicación de las GCK-III en esta vía.



Tabla 1. Resumen de la implicación de las GCK-III en la señalización MAPK. Adaptado de (Sugden, McGuffin et al. 2013).

GCK-III	Tipo Celular	Resultado	Referencias
Mst3	No definido	Su sobreexpresión no activa ERK1/2, JNK o p38MAPKs	(Schinkmann and Blenis 1997)
Mst3	Hek293	Su sobreexpresión activa ERK1/2 pero no JNK o p38MAPKs	(Zhou, Ling et al. 2000)
Mst3b	Hek293	Su sobreexpresión no activa MAPKs	(Zhou, Ling et al. 2000)
Mst3b	Neuronas DRG	Su eliminación con shRNA reduce la activación de ERK1/2	(Chen, Ng et al. 2009)
Mst3	HCT116	Células deficientes para Mst3 son resistentes a la muerte celular mediada por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por la mayor activación de JNK	(Chen, Ng et al. 2009)
Mst3	Trofoblastos	La inhibición de JNK previene la expresión de Mst3 inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> o hipoxia	(Wu, Lin et al. 2008, Wu, Lin et al. 2011)
Mst3	HeLa	Mst3 activa JNKs	(Lin, Wu et al. 2010)
SOK1	COS1, COS7, NIH 3T3 y otras	Su sobreexpresión no activa MAPKs	(Pombo, Bonventre et al. 1996, Osada, Izawa et al. 1997)
SOK1	Hela o PC-3 (¿)	En células expuestas a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , su sobreexpresión en combinación con CCM3/PDCD10 incrementa la actividad ERK1/2 y la eliminación de ambas reduce la actividad ERK1/2. No activa JNK o P38MAPK	(Zhang, Ma et al. 2012)
Mst4	Hek293	Su sobreexpresión no activa MAPKs	(Qian, Lin et al. 2001)
Mst4	Phoenix (una línea Hek293T)	Su sobreexpresión pero no la de su dominante negativo activa ERK1/2. No activa JNK o P38MAPK	(Lin, Chen et al. 2001)
Mst4	HeLa y PC-3	Su sobreexpresión en combinación con CCM3/PDCD10 activa ERK1/2	(Ma, Zhao et al. 2007)

### A. Papel en muerte celular

Las GCK-III se han relacionado con la inducción de apoptosis fundamentalmente tras su procesamiento o corte por caspasas (figura 3) y su posterior transporte al núcleo para inducir apoptosis a través de la vía de muerte mitocondrial. Mst3 se procesa *in vitro* por las caspasas 3, 7 u 8 y genera dos fragmentos de 35 kDa (fragmento N-terminal) y 15 kDa (fragmento C-terminal) haciéndolo susceptible de ser miristoilado (un proceso importante en la regulación de la apoptosis), revelando una secuencia de localización nuclear (NLS) y liberando las secuencias de exclusión nuclear (NES). Al igual que Mst3, SOK1 también es cortado por caspasas durante la muerte celular inducida por anoxia y especies reactivas de

oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) para generar un fragmento de 35 kDa N-terminal que se transloca desde el Golgi al núcleo para promover apoptosis. No obstante, muchos de los estudios llevados a cabo a este respecto se han hecho con estas quinasas sobreexpresadas, con la excepción de SOK1, por lo que los resultados han de interpretarse con especial cuidado (Sugden, McGuffin et al. 2013).

### **B. Funciones en el GOLGI y migración celular**

Las GCK-III se pueden localizar en el Golgi donde interaccionan directamente con una proteína cis de Golgi que facilita la fusión de vesículas en este orgánulo y se denomina GOLGA2/GM130, y lo hacen probablemente en asociación con CCM3/PDCD10. Se ha cuestionado en numerosas ocasiones si el STRIPAK podría tener una función en la integridad del Golgi puesto que sus componentes tales como CCM3 y las GCK-III también interaccionan con GOLGA2. Aunque no está clara la localización del STRIPAK dentro de la célula, se ha visto que sus componentes pueden operar en otros compartimentos independientes de este gran complejo y pasar de un complejo a otro en compañía de CCM3/PDCD10 como es el caso de Mst4. Asumiendo que la localización de Mst4 y la habilidad del Golgi para reposicionarse están interconectadas, la interpretación es que la unión de estriatinas, Mst4 y complejos STRIPAK al Golgi, reducen su reposicionamiento (Sugden, McGuffin et al. 2013). La eliminación tanto de SOK1 como de Mst4 causa la dispersión del Golgi lo que podría ser debido un efecto indirecto de estas quinasas sobre la red de microtúbulos. Se cree, al menos para el caso de SOK1, que influencia la integridad del Golgi gracias a su capacidad de fosforilar a la proteína 14-3-3 $\zeta$  (una proteína implicada en eventos de polaridad, adhesión y migración celular) (Preisinger, Short et al. 2004). Además estas quinasas resultan fundamentales para el proceso de migración y un dominante negativo de SOK1 o una forma activa de Mst4 bloquean este proceso. Esto se debe a que durante el proceso de migración el Golgi que se encontraba en una situación perinuclear y con orientación aleatoria se reposiciona y se sitúa en el frente de la dirección de migración. El mecanismo depende de la interacción de GM130 con SOK-1 y la subsiguiente fosforilación de 14-3-3 $\zeta$  (Preisinger, Short et al. 2004, Pombo, Force et al. 2007, Sugden, McGuffin et al. 2013).

### **C. Funciones en la membrana plasmática: organización del citoesqueleto y polaridad celular. Patologías endoteliales**

Las GCK-III se pueden encontrar asociadas a la membrana plasmática reclutadas por las adhesiones focales y los complejos de integrina mediante interacción con paxilina. También se asocian con las proteínas encargadas de la organización intracelular del citoesqueleto cortical de actina denominadas ERM. Un ejemplo de la interacción con ERM lo constituye Mst4. Bajo condiciones de estrés oxidativo como el inducido por  $H_2O_2$ , Mst4 se redistribuye desde el Golgi a la periferia de la célula donde gracias a la proteína adaptadora CCM3/PDCD10 es capaz de fosforilar a las ERM. Esto repercute en la estabilidad de las interacciones entre la membrana celular y el citoesqueleto promoviendo la supervivencia celular bajo este tipo de estrés y previniendo la apoptosis. También se cree que Mst3 puede actuar de la misma forma, pero su acción proapoptótica prevalece sobre la citoprotectiva. (Fidalgo, Guerrero et al. 2012, Sugden, McGuffin et al. 2013) (figura 6).

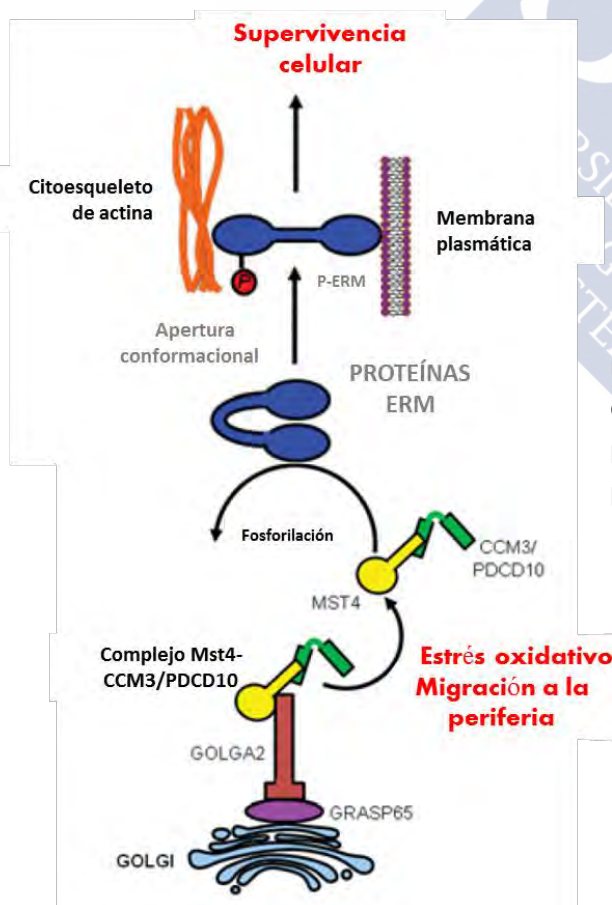


FIGURA 6. La fosforilación de las ERM por MST4 resulta citoprotectiva. El estrés oxidativo disocia el complejo CCM3/PDCD10 que entonces puede migrar a la periferia celular y permite que Mst4 fosforile a las ERM promoviendo la supervivencia celular. Adaptado de (Fidalgo, Guerrero et al. 2012, Sugden, McGuffin et al. 2013).

Las GCK-III también juegan un papel en la regulación de la polaridad celular a través de su interacción con otras proteínas como puede ser MO25. MO25 es una proteína de andamiaje que contiene el dominio característico “repeticiones armadillo” y forma un heterotrímero con LKB1 y STRAD alpha para regular la actividad de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*). El complejo LKB1-STRAD-MO25 es un importante regulador de la polaridad epitelial y neuronal (Filippi, de los Heros et al. 2011). STRAD y Mo25 interaccionan y activan a LKB1 en el citoplasma. Esto tiene como resultado la translocación de Mst4 desde las vesículas del Golgi a la membrana apical donde lleva a cabo la fosforilación y activación de Ezrina, la cual es esencial para la formación del borde en cepillo de las células epiteliales intestinales en el sitio apical. La inhibición de Mst4 impide la formación de este borde en cepillo (ten Klooster, Jansen et al. 2009).

Las malformaciones cavernosas cerebrales (CCM) son una patología vascular muy común que afecta a los vasos sanguíneos del cerebro. Estas lesiones se caracterizan por grupos de células endoteliales desordenadas que forman cavernas (regiones huecas) en la materia blanca del cerebro. Las formas familiares de la enfermedad se encuentran ligadas a mutaciones en CCM3 y otros dos genes, KRIT1/CCM1 y CCM2/OSM. Se ha propuesto que la regulación defectiva de Mst3 y Mst4 está implicada en la patología de estas malformaciones endoteliales. Específicamente, la fosforilación reducida de las proteínas ERM lleva asociado un incremento de la actividad de Rho en las células endoteliales, lo que perturba la función de la barrera endotelial (Thompson and Sahai 2015).

#### **D. Papel en la progresión del ciclo celular**

Mst4 presenta pequeñas diferencias estructurales en el dominio C-terminal que le permiten participar en procesos ciertamente distintos a sus homólogas Mst3 y SOK1. En el apartado anterior se mencionaba la capacidad de estas dos para promover procesos de apoptosis en condiciones de estrés celular, sin embargo Mst4 parece que contrariamente y gracias a su capacidad para activar a ERK 1/2 puede incrementar la proliferación celular. Mst3 además de su función proapoptótica, también presenta un papel en la progresión del ciclo celular mediante la fosforilación de NDR1 y NDR2 (*Nuclear Dbf2 (dumbbell-former 2)-related 1 y 2*). Esta fosforilación aumenta la actividad por autofosforilación de las NDR que

están implicadas en la duplicación del centrosoma y en la progresión G1/S (Ling, Lu et al. 2008).

#### **E. Funciones en metabolismo y diabetes tipo II.**

Recientemente se han descubierto efectos metabólicos para SOK1. Algunos artículos han establecido que la manipulación de los niveles de SOK1 resulta en una regulación alterada del metabolismo. Así, la inhibición de SOK1 en músculo aumenta la utilización de glucosa y la oxidación de lípidos tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que su sobreexpresión inhibe la oxidación de lípidos tanto en músculo como en hígado. Estos resultados apuntan a SOK1 como una posible diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades tan comunes como la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH, *nonalcoholic steatohepatitis*) (Nerstedt, Cansby et al. 2012, Cansby, Amrutkar et al. 2013, Amrutkar, Cansby et al. 2015, Amrutkar, Kern et al. 2015, Amrutkar, Chursa et al. 2016). En el capítulo de diabetes de esta introducción, se detallarán los mecanismos por los cuales SOK1 regula el metabolismo lipídico y de la glucosa.



## 2. DIABETES MELLITUS

### 2.1. Descripción

Diabetes mellitus (DM) se refiere a un grupo de enfermedades metabólicas comunes que comparten el fenotipo de hiperglucemia. Dependiendo de la etiología de la DM, los factores que contribuyen a esa hiperglucemia incluyen: una secreción de insulina reducida, una mayor producción de glucosa y una menor captación y utilización de la misma. Además la desregulación metabólica asociada a la DM produce cambios fisiopatológicos secundarios en múltiples órganos que suponen un tremendo impacto tanto para el propio individuo que padece diabetes como para el sistema sanitario al que pertenece y abarcan desde alteraciones microvasculares: retinopatía, nefropatía... y macro vasculares: complicaciones cardiovasculares como enfermedad coronaria, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares... hasta otras no vasculares: cataratas, glaucoma, enfermedades de la piel...

Con una incidencia mundial que va en aumento, la DM va camino de convertirse en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en un futuro próximo (Powers 2016).

### 2.2. Clasificación

La diabetes se clasifica en función del proceso patogénico que conduce a la hiperglucemia, aunque en ocasiones también se ha clasificado según otros criterios como la edad de inicio o en función de si se trata de diabetes insulina-dependiente o no-dependiente. Las dos grandes categorías reciben la designación de diabetes mellitus tipo 1 (DM1), y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Aunque las causas son distintas, ambos tipos de diabetes van precedidos de una fase de control anormal de la glucosa antes de que la enfermedad progrese. También existen otros tipos menores de diabetes causados por: mutaciones génicas específicas que afectan a la secreción o acción de la insulina; ciertas enfermedades del páncreas; o asociadas al consumo de algún fármaco. Recibe también especial atención la diabetes mellitus gestacional (GDM, *Gestacional Diabetes Mellitus*). A continuación, se muestra la tabla 2 con la clasificación etiológica de los tipos de diabetes:

TABLA 2. Tipos de Diabetes Mellitus. Adaptado de (Powers 2016).

<p><b>Diabetes tipo 1:</b> (destrucción de células B, deficiencia absoluta de insulina)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•A. Mediada por inmunidad</li> <li>•B. Idiopática</li> </ul>
<p><b>Diabetes tipo 2:</b> (puede evolucionar desde un estado inicial de resistencia a insulina hasta un estado de deficiencia en la secreción de insulina)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•A. Susceptibilidad genética +</li> <li>•B. Factores ambientales: <ul style="list-style-type: none"> <li>•Obesidad</li> <li>•Nutrición</li> <li>•Actividad física</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>Otros tipos específicos de diabetes</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•A. Mutaciones que afectan a la función de células beta. Ej: Factor de transcripción nuclear de hepatocitos (HNF) 4<math>\alpha</math> (MODY 1), Glucoquinasa (MODY 2), proinsulina o insulina...</li> <li>•B. Defectos genéticos en la acción de la insulina. Ej: Resistencia a insulina tipo A, lipodistrofias...</li> <li>•C. Enfermedades del páncreas exócrino. Ej: Pancreatitis, neoplasia, fibrosis quística...</li> <li>•D. Endocrinopatías. Ej: Acromegalia, síndrome de Cushing...</li> <li>•E. Inducida por fármacos o químicos. Ej: glucocorticoides, <math>\alpha</math>-interferon...</li> <li>•F. Infecciones. Ej: citomegalovirus...</li> <li>•G. Formas menos comunes mediadas por inmunidad. Ej: presencia de anticuerpos anti receptor de insulina.</li> <li>•H. Otros síndromes genéticos con diabetes asociada: Ej: Síndrome de Down, síndrome de Turner...</li> </ul>
<p><b>Diabetes mellitus gestacional</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Cambios metabólicos durante el embarazo</li> <li>•Mayores requerimientos de insulina</li> </ul>



### 2.3. Epidemiología

La prevalencia mundial de la diabetes se ha incrementado considerablemente en las dos últimas décadas desde unos 30 millones de casos que se estimaron en 1985 hasta los 415 millones de 2015. Aún más, se prevé que para el año 2040 ese número se incremente hasta alcanzar los 642 millones de personas afectadas (figura 7). Estas cifras suponen que actualmente el 8,8% de la población mundial sufre de diabetes, lo que se traduce en 1 de cada 11 personas mientras que, en 2040, 1 de cada 10 personas la padecerá. Por otro lado, se calcula que 1 de cada 2 adultos con diabetes no ha sido diagnosticado. De todos los casos estimados para 2015, 5 millones desencadenaron el fallecimiento del individuo pudiendo convertir a la diabetes en la quinta causa de muerte por encima incluso de enfermedades como el VIH y acarreando el 12% gasto mundial en salud (IDF 2015).

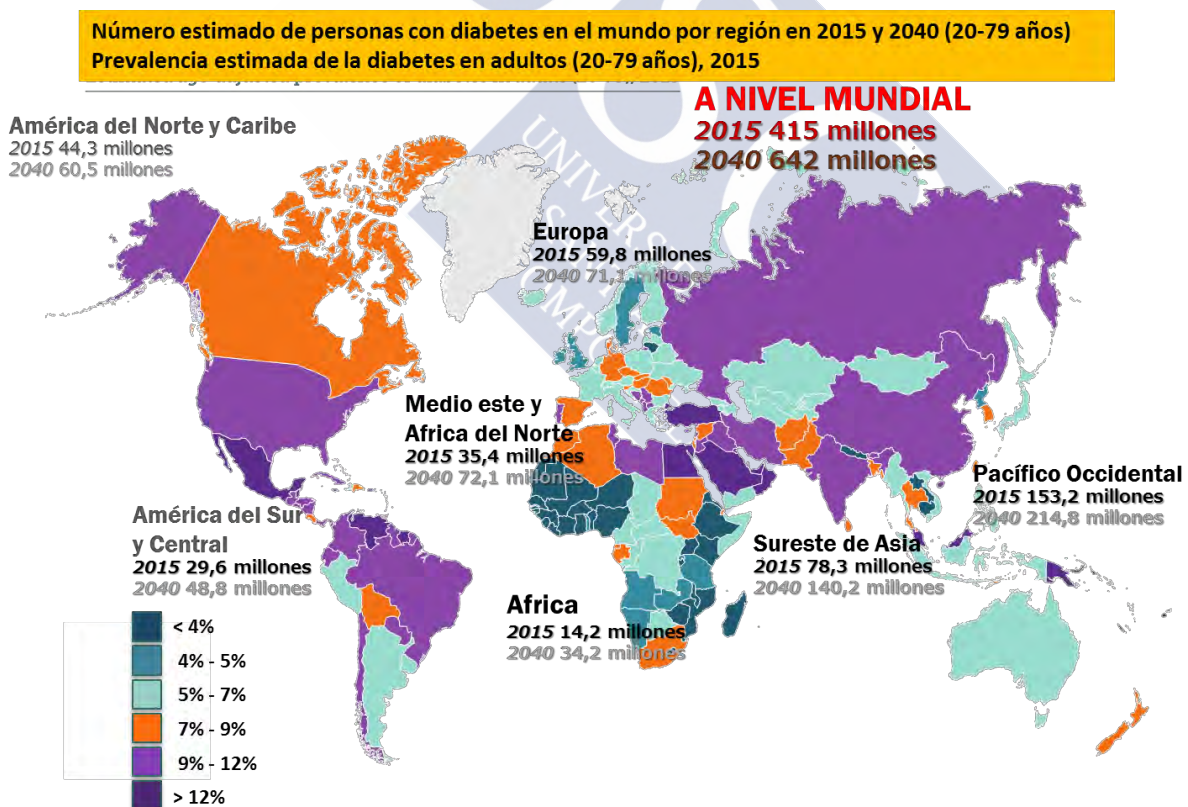


FIGURA 7. Número y prevalencia estimados de diabetes entre los 20-79 años a nivel mundial. Adaptado de (IDF 2015).



Aunque la prevalencia de ambos tipos de DM (1 y 2) va en aumento, la prevalencia de la DM2 se alza más rápidamente y supone el 90% de los casos, debido al incremento en obesidad, a los niveles reducidos de actividad como consecuencia de la industrialización y del envejecimiento de la población. Afecta prácticamente por igual a hombres y mujeres y aumenta con la edad de forma que la mayor prevalencia la encontramos en individuos > 65 años (hasta un 30% aproximadamente), mientras que en los < 20 años la prevalencia ronda el 0,2%. Sin embargo, cada vez se diagnostica más frecuentemente en niños y jóvenes adultos, especialmente adolescentes obesos. Se estima que entre el 5 y el 10% de los individuos que desarrollan DM antes de los 30 años tienen la tipo 1 (IDF 2015, Powers 2016).

## 2.4. Diagnóstico

Al hablar de DM es importante definir previamente varios términos dado que es un proceso que pasa por varias fases antes de definirse como tal y sufre una evolución desde su comienzo pudiendo derivar a otras complicaciones. En primer lugar, es necesario referirse al término **tolerancia a glucosa** que se valora usando fundamentalmente tres, e incluso cuatro parámetros que al alcanzar determinados valores permiten determinar un estado normal, de prediabetes o diabetes mellitus (Association 2015, Powers 2016) (figura 8):

**A. Glucosa plasmática en ayunas (FPG, *Fasting plasma glucose*).** Se determina la glucosa tras al menos 8 horas de ayuno, generalmente a primera hora de la mañana. Si el individuo alcanza o supera valores de glucosa de 126 mg/dL se le diagnostica de diabetes. Este parámetro también permite definir un estado de **hiperglucemia en ayunas o intolerancia a la glucosa en ayunas (IFG, *Impaired Fasting Glucose*)** u homeostasis anormal de la glucosa en ayunas que la OMS (Organización Mundial de la Salud) define cuando los valores de glucosa sanguínea en ayunas se encuentran entre 110-125 mg/dL y se considera un estado prediabético.

**B. Test de tolerancia oral a la glucosa (OGTT, *Oral glucose tolerance test*).** Este test consiste en la administración por vía oral de una bebida que contiene una carga de 75 g de glucosa. Si transcurridas 2 horas después de su consumo, la glucosa en sangre alcanza valores de 200 mg/dL o mayores, se considera un estado de diabetes. Este test permite definir un estado previo de **intolerancia a la glucosa (IGT, *Impaired Glucose Tolerance*)**, que

se considera un estado prediabético de hiperglucemia con resistencia a insulina cuando los valores de glucosa en sangre se mantienen entre 140-199 mg/dL 2 horas después del inicio del OGTT. Se puede permanecer en estado de IGT durante algunos años antes de alcanzar la diabetes.

**C. Hemoglobina A1C.** La prueba de A1C mide el porcentaje de hemoglobina glucosilada proporcionando una media de la glucosa sanguínea medida durante los últimos dos o tres meses. Un valor de A1C comprendido entre 5,7-6,4% es indicativo de prediabetes y se considera que un nivel del 6,5% o más, es indicativo de diabetes. Es muy útil para comprobar la eficacia de un tratamiento.

**D. Prueba aleatoria (o casual) de glucosa plasmática.** Esta prueba es un análisis de sangre en cualquier momento del día cuando se tienen síntomas de diabetes severa. Se diagnostica diabetes cuando la glucosa en la sangre  $\geq 200$  mg/dl

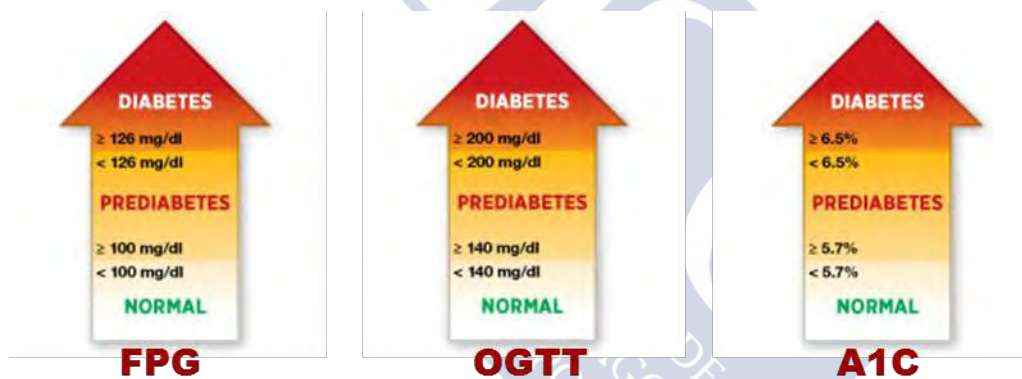


FIGURA 8. Pruebas para el diagnóstico de diabetes y valores de glucosa en sangre indicativos del estado normal, prediabetes o diabetes. FPG (Fasting Plasma Glucose), OGTT (Oral Glucose Tolerance Test), A1C (Tipo de Hemoglobina) (Association 2015).

## 2.5. IFG e IGT

Entender la historia natural de la diabetes tipo 2 es esencial para la detección temprana de la hiperglucemia prediabética y para la interrupción de la progresión desde homeostasis normal hacia intolerancia a la glucosa. Por ello es necesario referirse con claridad a los dos términos característicos de la prediabetes IGT e IFG que constituyen herramientas para predecir el elevado riesgo de padecer diabetes, aunque ambas situaciones no tienen que darse al mismo tiempo. La IFG representa niveles de glucosa plasmática en ayunas

medianamente elevados que no siempre tienen por qué acompañarse de valores anormales de glucosa a las 2 horas de la realización de un test OGTT. De la misma forma, podemos tener una situación de **IGT** caracterizada por valores anormales de glucosa después del test sin que los valores de glucosa plasmática en ayunas estén alterados. Aunque se ha considerado la IGT como un mejor predictor del riesgo de diabetes existe cierta controversia y algunos estudios muestran a estos dos factores como situaciones consecutivas en la progresión de la enfermedad hacia la diabetes por lo que IFG constituiría la antesala que evolucionaría hacia IGT y finalmente se desencadenaría la DM2 (Meigs, Muller et al. 2003).

## 2.6. Etiopatogenia DM1 y DM2

La DM1 es una enfermedad de graves consecuencias para el individuo y su etiopatogenia está bastante delimitada hacia un proceso autoinmune que consiste en la infiltración de linfocitos en los islotes pancreáticos que destruyen las células  $\beta$ -pancreáticas y desencadenan un proceso inflamatorio (figura 9). Este proceso parece originarse en muchas ocasiones por la influencia de diversos factores ambientales como son la infección por determinados virus (p.ej. enterovirus), toxinas, proteínas de leche bovina, o ciertos compuestos químicos, en individuos con cierta susceptibilidad genética. Aunque la influencia del componente genético no es tan relevante como en el caso de la DM2, se han identificado perfectamente regiones cromosómicas relacionadas con su desencadenamiento. Así, por ejemplo, polimorfismos en el complejo HLA del cromosoma 6 confieren un riesgo de padecer DM1 del 40-50%. Esta región contiene genes que codifican moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II, *Major Histocompatibility Complex class II*) implicadas en el inicio de la respuesta inmune. Otros genes confieren protección frente a la enfermedad (Powers 2016).

Mientras que la DM1 se caracteriza por un defecto en la secreción de insulina por las células  $\beta$ , la DM2 puede consistir no sólo en una falta de sensibilidad a insulina (**resistencia a insulina**) sino que además puede ir acompañado de una **secreción anormal** de esta hormona (figura 9). Como se mencionaba brevemente en la tabla 2, la causa de la DM2 es multifactorial pues además de la elevada susceptibilidad genética, influyen en la modulación de su fenotipo factores ambientales como la obesidad, nutrición y actividad física. Puesto

que es una enfermedad que tiene un fuerte componente genético, el riesgo de padecer diabetes aumenta si uno de los padres la padece y la probabilidad es de un 40% si la padecen ambos progenitores. Presenta un carácter poligénico y los genes que la predisponen no están completamente identificados. Se han hecho estudios de asociación del genoma completo e identificado varios genes que conllevan cierto riesgo para la DM2. Polimorfismos en el gen que codifica al receptor activado por proliferadores de peroxisomas (*PPAR- $\gamma$* , *Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma*) o el gen que codifica la calpaína-10 (*CPN10*) son algunos ejemplos. Estudios más recientes, encontraron nuevos loci con variaciones como el factor de transcripción 7-like 2 (*TCF7L2*, *Transcription Factor 7-like 2*) que se relacionan en varias poblaciones tanto con la DM2 como con la intolerancia a glucosa y complicaciones cardiovasculares asociadas. Aunque no se conocen ciertamente los mecanismos por los que estos loci genéticos aumentan la susceptibilidad a padecer DM2, se cree que fundamentalmente lo hacen afectando a la función de los islotes de células  $\beta$ -pancreáticas, o a la secreción de insulina. En el caso de *TCF7L2* se cree que podría estar afectando a la señalización por glucagón. Además, estos genes por sí solos no se pueden responsabilizar de forma aislada de su influencia para el desarrollo de la enfermedad, sino a la interacción de estos con factores ambientales o las interacciones gen-gen (Tong, Lin et al. 2009, Fuchsberger, Flannick et al. 2016, Powers 2016).

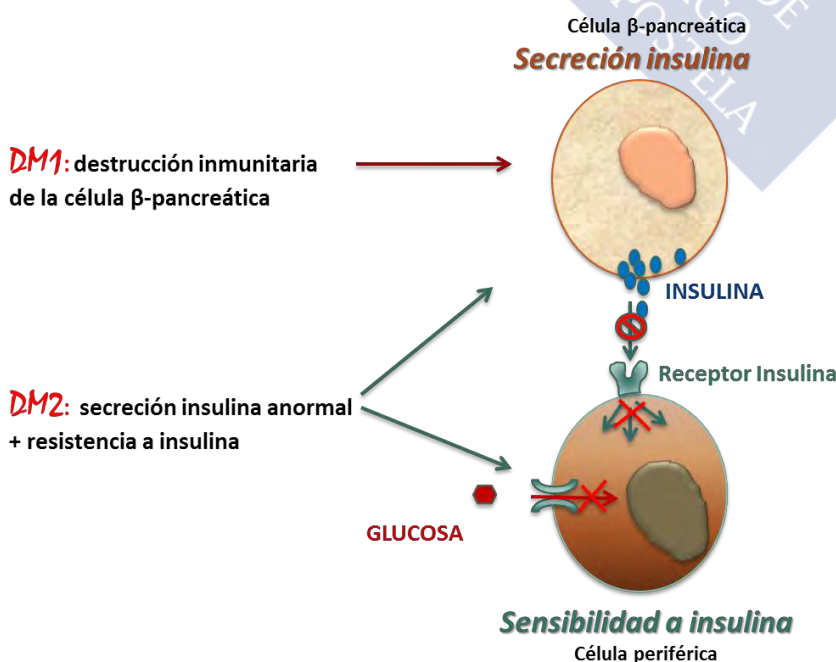


FIGURA 9. Características principales de los dos grandes tipos de DM. La DM1 se caracteriza por un déficit de insulina secundario a la destrucción inmunitaria de la célula  $\beta$ -pancreática. La DM2 es el resultado de la combinación de un defecto en la sensibilidad a la insulina y la secreción de esta hormona. Adaptado de (Medina-Gómez 2004).

### 3. DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2)

#### Fisiopatología de la DM2

La DM2 se caracteriza por una serie de condiciones que se abordarán detalladamente a lo largo de este capítulo 3 y son las siguientes:

- ✓ obesidad central o visceral (en el 80% de casos)
- ✓ resistencia a insulina
- ✓ secreción anormal de insulina
- ✓ metabolismo anormal de las grasas
- ✓ producción excesiva de glucosa en hígado (gluconeogénesis)

#### **3.1. Obesidad, factor de riesgo para la DM2**

Junto con la predisposición genética, la obesidad es uno de los principales factores de riesgo para DM2. Se ha responsabilizado ampliamente a factores ambientales de la actual epidemia de obesidad puesto que la elevada disponibilidad calórica y consumo de grasas en el contexto de una menor actividad física conducen a un estado de sobrealimentación y aumento de las reservas de nutrientes. La obesidad es por tanto el resultado de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, aunque se han identificado genes que predisponen a padecerla y se suman a la influencia del ambiente. Así es el caso de las mutaciones en el receptor de melanocortina 4 que responden al 4% de los casos severos de obesidad. Otros casos más raros incluyen mutaciones en la leptina y su receptor, en la prohormona convertasa 1 (PC1) y en la pro-opiomelancortina (POMC) (Kahn, Hull et al. 2006).

La obesidad supone actualmente una epidemia incluso más dramática que la de la DM2 y es la causa más común de resistencia a insulina en hombres. Como consecuencia, la resistencia a insulina inducida por obesidad es el factor dominante para la creciente oleada de DM2. De hecho, más del 80% de los casos de diabetes tipo 2 en Estados Unidos se asocia con un estado sobrepeso (Jin and Patti 2009).

### 3.2. Resistencia a insulina y secreción anormal de insulina

La condición de resistencia a insulina comprende un amplio espectro de alteraciones con hiperglucemia como rasgo característico y habitualmente se incluye dentro de un término más amplio conocido como **síndrome metabólico, síndrome X o síndrome de resistencia a insulina** que engloba no sólo la resistencia a insulina, sino que también toda una constelación de desórdenes como la hipertensión, dislipidemia (bajos niveles de colesterol HDL y elevados de triglicéridos), IGT e IFG, riesgo elevado de enfermedad cardiovascular arteriosclerótica... (Moller and Kaufman 2005).

Una alimentación rica en grasas de forma prolongada se asocia no sólo con el desarrollo de obesidad sino también con resistencia a insulina y a una reducción en la liberación de esta hormona. Este efecto tiene importantes consecuencias si la función de las células  $\beta$  ya es anormal debido a susceptibilidad genética. Para que la obesidad y la resistencia a insulina se asocien con DM2, las células  $\beta$  deben ser incapaces de compensar totalmente la falta de sensibilidad a insulina (figura 10). Es motivo de debate en cuanto a la DM2 qué se desarrolla primero, si la resistencia a insulina o la destrucción de células  $\beta$ . La hipótesis más aceptada se decanta por la idea de que la resistencia a insulina precede a un defecto en la secreción de insulina, pero la diabetes se desarrollaría sólo cuando su secreción es inadecuada (figura 10). Así la secuencia de los eventos sería la siguiente: en estadios tempranos, a pesar de que se reduce la sensibilidad a insulina (punto A), la tolerancia a glucosa es normal porque las células  $\beta$ -pancreáticas intentan compensar el defecto en la señalización de insulina produciendo un aporte extra (punto B). A medida que la resistencia a insulina y la **hiperinsulinemia compensatoria** progresan, los islotes pancreáticos se vuelven incapaces de mantener el estado hiperinsulinémico. En ese momento se desarrolla IGT o **intolerancia a glucosa** (punto C) caracterizada por la incapacidad de regular la glucosa postprandial. Además, el defecto en la secreción de insulina impide la captación de glucosa en los tejidos sensibles a insulina, llevando a un **aumento de la producción de glucosa hepática** por gluconeogénesis y alcanzándose un estado de **IFG o intolerancia a glucosa en ayunas**. En último lugar, se produce un **fallo completo las células  $\beta$**  y por tanto DM2 (punto D).



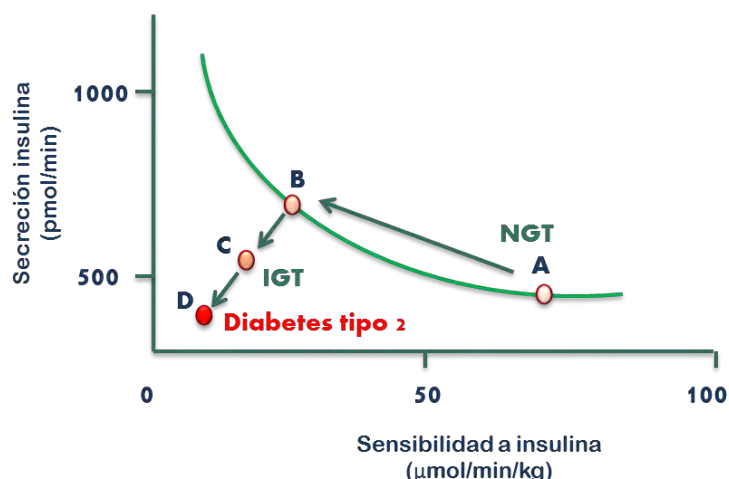


FIGURA 10. Cambios metabólicos durante el desarrollo de la DM. La secreción de la insulina y la sensibilidad de la insulina están relacionadas. A medida que un individuo se vuelve más resistente a la insulina (evolución desde el punto A hacia el B), la secreción de insulina aumenta. Ello conduce a un estado de intolerancia a la glucosa (IGT, punto C) y finalmente se alcanza la DM2 (punto D). Adaptado de (Bergman and Ader 2000).

### 3.3. Metabolismo anormal de las grasas y otros mecanismos moleculares que conducen a resistencia a insulina

Entender la etiopatogenia de la resistencia a insulina se ha vuelto crucial a la hora de desarrollar futuras terapias para frenar la progresión hacia DM2 y otras complicaciones asociadas. Entre los mecanismos propuestos en los últimos años, varios autores coinciden en un listado de eventos y alteraciones que se desencadenan con la obesidad y que convergen en un descontrol de las vías comunes que regulan la acción de la insulina. Las interacciones entre obesidad, resistencia a insulina, intolerancia a la glucosa y funcionamiento inapropiado de las células  $\beta$  parecen tener que ver con los cambios experimentados por el **tejido adiposo** durante el desarrollo de la obesidad. El tejido adiposo es un tejido endocrino muy importante que modula el metabolismo sistémico mediante la liberación por los adipocitos de ácidos grasos no esterificados (**NEFAs, Non Sterified Fatty Acids**) también llamados ácidos grasos libres (FFA, *Free Fatty Acids*), **glicerol**, **hormonas como la leptina, adiponectina, resistina y proteína de unión a retinol 4 (RBP-4, Retinol Binding Protein 4)**. Además, cuando se produce daño celular e inflamación, se liberan citoquinas pro inflamatorias producidas por los macrófagos del tejido adiposo como pueden ser el factor de necrosis tumoral (**TNF- $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor- $\alpha$** ), interleuquina 6 (**IL6**) y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (**MCP-1, Monocyte Chemoattractant Protein-1**). Con la obesidad los adipocitos aumentan

de tamaño, se hipertrofian e incrementan la liberación de NEFAs y citoquinas proinflamatorias, un patrón que parece contribuir a la resistencia a insulina sistémica (Kahn, Hull et al. 2006, Rosen and Spiegelman 2006). A continuación, se enumeran en detalle las alteraciones que se producen en el tejido adiposo y que conducen a esa resistencia:

### 3.3.1. Ácidos grasos libres (NEFAS o FFA)

La liberación de NEFAs parece uno de los factores aislados más críticos en la modulación de la sensibilidad a insulina. La asociación entre lípidos y resistencia a insulina ya se propuso en 1963 con los estudios de Randle y colaboradores que propusieron que los ácidos grasos impedían la captación de glucosa en algunos modelos de músculo mediante la inhibición de la piruvato deshidrogenasa llevando a una reducción en la oxidación de glucosa por glucólisis y a la acumulación de intermediarios glucolíticos como el citrato (Randle, Garland et al. 1963, Rosen and Spiegelman 2006) (figura 11).

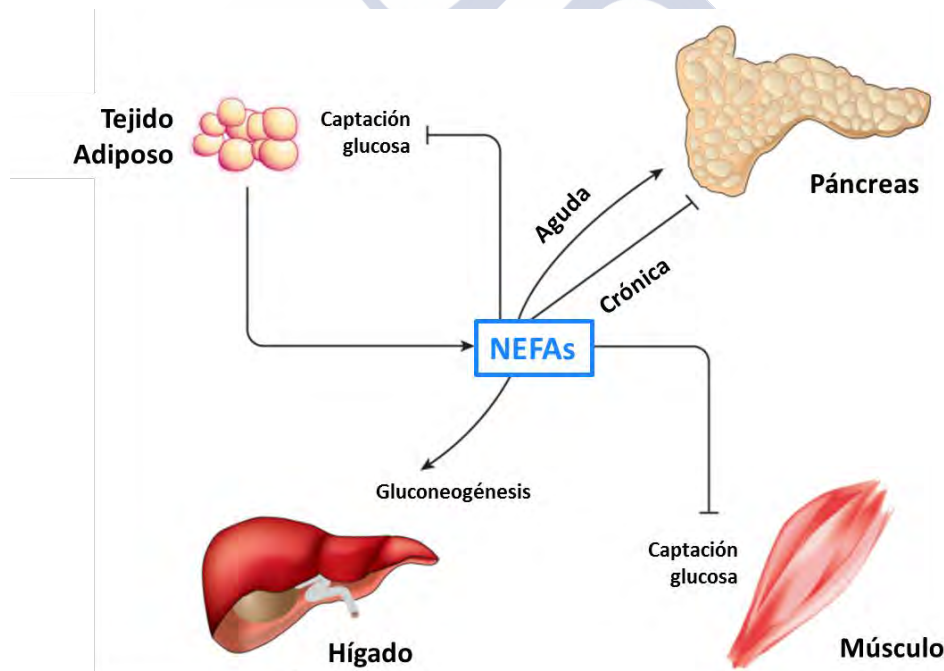


FIGURA 11. Efectos diversos de los NEFAs sobre la homeostasis de la glucosa. La resistencia a insulina se asocia con un incremento en la lipólisis y la liberación de NEFAs a la circulación. Los elevados niveles de NEFAs inhiben la habilidad de la insulina para aumentar la captación de glucosa en músculo y grasa y de reducir la gluconeogénesis hepática. Un aumento agudo de NEFAs (después de la ingesta) tiende a estimular la secreción de insulina, mientras que la exposición crónica (como ocurre con resistencia a insulina) tiende a reducir la secreción de insulina por el páncreas (Kahn, Hull et al. 2006). Adaptado de (Rosen and Spiegelman 2006).



El concepto de “**lipotoxicidad**” mantiene que los elevados niveles circulantes de ácidos grasos se acumulan intracelularmente en los distintos órganos con función metabólica:

**A. En músculo, la acumulación lipídica intramiocelular** puede llevar a la condición de resistencia a insulina (Krssak, Falk Petersen et al. 1999). Cuando este excedente de ácidos grasos circulantes difunde a las células de músculo, rápidamente se esterifican con coenzima A dando lugar a acil-CoAs. Seguidamente se pueden conjugar con glicerol para formar mono, di o triacilgliceroles o esterificarse con esfingosina para formar ceramidas. Tanto los diacilgliceroles (**DAGs**) como las ceramidas actúan como segundos mensajeros en la señalización de algunas rutas importantes, pero en exceso, constituyen factores lipotóxicos que interfieren en la señalización de la insulina. Así por ejemplo, la acumulación de **DAGs** activa a algunos miembros de la familia de proteínas quinasa C (PKC), las denominadas **novel PKCs** (nPKCs:  $\delta, \epsilon, \eta, \theta$ ) y distintas de las **PKCs convencionales** (cPKCs:  $\alpha, \beta I, \beta II, \gamma$ ) (Itani, Ruderman et al. 2002). Concretamente, se sabe que PKC $\theta$  puede fosforilar al sustrato del receptor de insulina (IRS1, *Insulin Receptor Substrate 1*) en serina 1101, lo que inhibe la fosforilación en tirosina requerida para la transmisión de la señal de la insulina, impidiendo la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y disminuyendo como consecuencia la velocidad de fusión de las vesículas que contienen GLUT4 con la membrana plasmática. Así, se reduce la cantidad de glucosa que entra en las células musculares y esta se deriva al hígado. En cuanto a las **ceramidas**, impiden la señalización de la insulina *downstream* de IRS1. Se cree que las ceramidas activan por un lado a PP2A quien defosforila a AKT, y por otro, que actúan aumentando el secuestro de AKT por una de las isoformas de **PKCs atípicas** (aPKC $\zeta$ ), lo que resulta en su inactivación y en una menor entrada de glucosa a las células (Samuel and Shulman 2012) (figura 12) .

Además de afectar a la captación de glucosa en músculo, la falta de activación de AKT derivada de la acumulación de lípidos produce un descenso de la síntesis de glucógeno por medio de la glucógeno sintasa (figura 12).

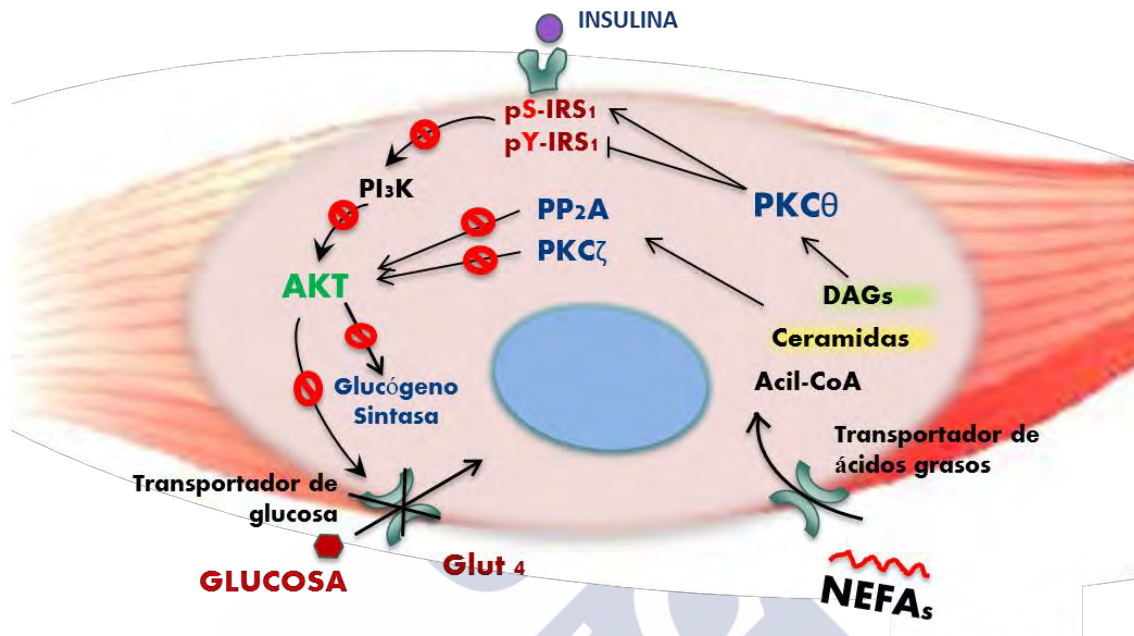


FIGURA 12. Lipotoxicidad y resistencia a insulina. La entrada de ácidos grasos (NEFAs) en la célula muscular se asocia con un incremento en sus metabolitos Acil-CoA, DAG y ceramidas. Estos factores activan la proteína quinasa C, que, a su vez, inactiva el sustrato del receptor insulínico (IRS1) y anula la señal de la insulina mediada por la PI3K. El resultado final es la caída del transporte de glucosa. Adaptado de (Medina-Gómez 2004).

**B. En hígado, la acumulación ectópica de lípidos** también llamada NAFLD (*Nonalcoholic Fatty Liver Disease*), produce un desequilibrio en el balance entre la captación y exportación de ácidos grasos que puede conducir a resistencia hepática a insulina. Aún más, se ha propuesto que es la acumulación intrahepática de lípidos la juega un papel en el desarrollo de esta resistencia y no la masa grasa visceral puesto que la eliminación quirúrgica del tejido adiposo visceral no mejora la sensibilidad a insulina o la homeostasis de la glucosa de individuos diabéticos tipo 2, mientras que si lo hace una dieta hipocalórica que reduce el contenido en grasa del hígado en un 85% (Fabbrini, Magkos et al. 2009, Fabbrini, Tamboli et al. 2010). Similar a lo que ocurría en el músculo, en el hígado, los DAGs median la activación de PKCε e impiden la señalización de la insulina. Las ceramidas por su parte median el incremento en PP2A (Teruel, Hernandez et al. 2001) y favorecen el secuestro de AKT por

PKC $\zeta$  (Powell, Hajdich et al. 2003) lo que en último lugar lleva a la inactivación de FOXO1 y el aumento en la expresión de genes gluconeogénicos como PEPCK y G6PC. AKT inactivada, por otra parte, no puede promover la síntesis de glucógeno mediada por insulina. En cuanto a la lipogénesis del propio hígado, esta se ve aumentada dando lugar a un empeoramiento de la situación (Samuel and Shulman 2012) (tabla resumen 3).






**C. En el tejido adiposo,** también se ha propuesto que se genera resistencia a insulina debido a los elevados niveles de lípidos circulantes procedentes de una dieta alta en grasa. Como consecuencia del déficit de señalización de la insulina en este tejido, se desencadenaría un aumento de la lipólisis liberándose aún más lípidos que irían a reesterificarse a otros tejidos como el hígado y exagerarían más si cabe la resistencia a insulina sistémica (Kahn, Hull et al. 2006) (tabla resumen 3).

**D. El páncreas,** como se explicó anteriormente, en estadios tempranos de resistencia a insulina, intenta compensar el defecto en la señalización mediante el aumento de la producción de insulina. Sin embargo, elevados niveles de NEFAs se asocian con una inhibición de la síntesis y secreción de insulina y también impiden esa respuesta compensatoria inicial de las células  $\beta$ . El déficit de insulina tiene como consecuencia unos niveles extremadamente elevados de glucosa en sangre que se consideran dañinos para las células  $\beta$  y que contribuyen a aumentar la resistencia a insulina bajo el término de “**glucotoxicidad**”.

Los elevados niveles de glucosa junto con una exposición crónica a NEFAs, constituyen una sinergia que podría explicar la relación entre la afectación de la función de las células  $\beta$  y la resistencia a insulina bajo el concepto conocido como “**GLUCOLIPOTOXICIDAD**”. Además, a lo anterior puede añadirse un tercer componente que es el riesgo genético para la disfunción de las células  $\beta$  en cuyo caso la progresión desde intolerancia a glucosa hacia diabetes tipo 2 es bastante probable (Kahn, Hull et al. 2006) (tabla resumen 3).

**E. A nivel de hipotálamo,** la resistencia a insulina favorece la transmisión de señales para aumentar la ingesta y esto contribuye al estado de obesidad y por tanto a empeorar la propia condición de resistencia (Kahn, Hull et al. 2006) (tabla resumen 3).

TABLA RESUMEN 3. Regulación postprandial de la insulina en los principales órganos metabólicos y cambios que se producen desde condiciones normales a DM2 inducida por obesidad y desarrollo de resistencia a insulina. Elaborada a partir de (Kahn, Hull et al. 2006), (Samuel and Shulman 2012).

ACCIÓN POSTPRANDIAL DE LA INSULINA		
Tejido	NORMAL	OBESIDAD, DM <sub>2</sub> Resistencia a Insulina
<b>Páncreas</b> 	↑ Síntesis y secreción insulina	<b>GLUCOLIPOTOXICIDAD + Riesgo genético</b> ↑↑ Insulina: Efecto compensatorio inicial ↓ Insulina: <b>DISFUNCIÓN CÉLULAS β</b>
<b>Tejido Adiposo</b> 	↑ Lipogénesis ↓ Lipólisis	<b>Liberación de NEFAs al torrente</b> ↑ Lipólisis
<b>Hígado</b> 	↑ Síntesis de glucógeno ↓ Gluconeogénesis	<b>Acumulación ectópica de lípidos</b> ↓ Síntesis de glucógeno ↑ Gluconeogénesis ↑ Lipogénesis
<b>Músculo</b> 	↑ Captación de glucosa ↑ Síntesis de glucógeno	<b>Acumulación lipídica intramiocelular</b> ↓ Captación de glucosa ↓ Síntesis de glucógeno
<b>Cerebro</b> 	↓ Ingesta	↓ Señalización insulina en hipotálamo ↑ Ingesta, ganancia de peso: <b>OBESIDAD</b>

### 3.3.2. Estrés de retículo endoplásmico (estrés ER) y respuesta a proteínas desplegadas (UPR, *Unfolded Protein Response*)

En los últimos años se ha asociado a la obesidad con la activación de la señalización de estrés celular y de las rutas inflamatorias. Un protagonista claro en la respuesta a estrés celular es el retículo endoplásmico (ER, *Endoplasmic Reticulum*), un entramado de membranas que tiene como función la síntesis y procesamiento de proteínas secretoras y de membrana. Algunas condiciones patológicas conllevan un estrés que interfiere en la homeostasis del ER y conducen a la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen de este orgánulo. Entre las condiciones que disparan el estrés ER están la privación de nutrientes o glucosa, las infecciones virales, acumulación de lípidos,

incremento de la síntesis de proteínas secretoras y la expresión de proteínas mutantes o mal plegadas, algunas de las cuales se dan con la obesidad. Algunos autores postularon que la obesidad podría ser un estímulo crónico desencadenante del estrés ER en tejidos periféricos, fundamentalmente tejido adiposo e hígado y que quizás este a su vez es un mecanismo fundamental implicado en el desencadenamiento de la resistencia a insulina y la diabetes tipo 2 (Özcan, Cao et al. 2004).

Para combatir este estrés, la célula activa un sistema de transducción de señales que relaciona al lumen del retículo con el citoplasma y el núcleo en lo que se conoce como UPR. El sistema UPR consta de tres brazos canónicos que trabajan para reducir las proteínas desplegadas del lumen del retículo: enzima-1 dependiente de inositol (**IRE-1 $\alpha$** , *Inositol Requiring enzyme 1 alpha*), PKR-like ER quinasa (**PERK**) y factor de transcripción activante 6 (**ATF16**, *Activating Transcription Factor 6*). La UPR está muy ligada a la regulación de la lipogénesis permitiendo la expansión de la membrana del ER e incrementando su capacidad de manejar proteínas. La capacidad de UPR para causar resistencia a insulina depende en último término de si la activación de sus componentes altera el balance entre lipogénesis y exportación lipídica. Además, en presencia de estrés ER aumenta la fosforilación de IRE-1 $\alpha$  lo que conduce al reclutamiento del factor 2 asociado a receptor de TNF (TRAF2, *TNF Receptor Associated Factor 2*) y a la activación de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK1). Como consecuencia se desencadena la fosforilación en serina 307 de IRS1 que como anteriormente se explicó lleva a un defecto en la señalización de insulina (Samuel and Shulman 2012). Adicionalmente, se ha visto que el estrés ER afecta igualmente a la función y supervivencia de las células  $\beta$ , y ratones *knockout* para el brazo PERK de la UPR exhibían un fenotipo de destrucción de islotes pancreáticos que recordaba a la DM1 en humanos (Harding, Zeng et al. 2001). Por tanto, el estrés metabólico inducido por obesidad genera, entre otros muchos efectos, un estrés ER que subyace al desencadenamiento de respuestas de estrés e inflamación que alteran la homeostasis de la glucosa y suponen un mecanismo central para explicar tanto la resistencia a insulina como el deterioro de las células  $\beta$  que conducen en último lugar a la diabetes tipo 2.



### 3.3.3. Inflamación

Algunos autores demostraron que en condiciones de obesidad se genera inflamación crónica en el tejido adiposo que explicaría al menos parcialmente la resistencia a insulina inducida por obesidad (Hotamisligil, Shargill et al. 1993). Cuando la adiposidad alcanza un cierto umbral, los adipocitos liberan una serie de factores que inducen la activación de macrófagos y su infiltración en el tejido adiposo. Los macrófagos de tejido adiposo (ATMs, *Adipose Tissue Macrophages*) están altamente activados y presentan una expresión alta de genes proinflamatorios que incluyen un conjunto de citoquinas y TNF- $\alpha$ , que se secretan en exceso. La unión de TNF- $\alpha$  a su receptor puede llevar a la activación de quinasas intracelulares como JNK1 e IKK $\beta$ , lo que inhibe la señalización del receptor de insulina por la fosforilación en serina 307 de su sustrato IRS1. Esto proporcionaría un mecanismo plausible para explicar la relación entre inflamación y resistencia a insulina (Xu, Barnes et al. 2003, Johnson and Olefsky 2013) (figura 13). Además, la inflamación del tejido adiposo podría incrementar la lipólisis, aunque no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual lo hace. Se postula que podría hacerlo a través de un descenso en proteínas estabilizantes de gotas lipídicas como la perilipina (Bezaire, Mairal et al. 2009). Un exceso de lipólisis en el tejido adiposo podría conducir a la re-esterificación de ácidos grasos que se derivan a otros tejidos y contribuir así a la acumulación ectópica de lípidos en hígado. Las citoquinas secretadas por los macrófagos (TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1) pueden señalizar en otros tejidos metabólicos como músculo e hígado produciendo cambios en el balance energético que explicarían una condición de resistencia a insulina generalizada (Samuel and Shulman 2012).

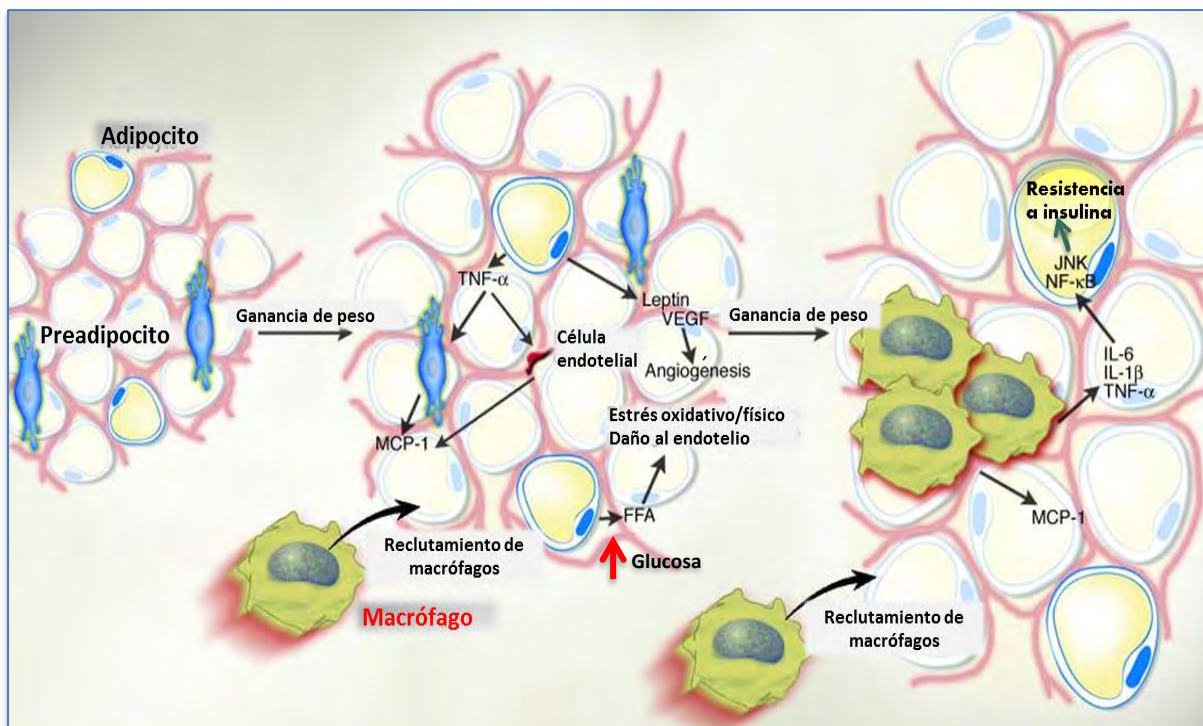


FIGURA 13. El tejido adiposo obeso se caracteriza por la inflamación y la infiltración progresiva de macrófagos. Con la obesidad se producen cambios físicos y en la función parácrina del adipocito. Se secreta  $\text{TNF-}\alpha$  y citoquinas que hacen que tanto los preadipocitos como las células endoteliales produzcan MCP-1. Esto junto con los elevados niveles de leptina hace que se estimule el transporte de macrófagos hacia el tejido adiposo y que a su vez produzca más MCP-1 y otras citoquinas que llevan a la activación de quinasas de estrés como JNK1 y  $\text{NF}\kappa\text{B}$  y a un estado de resistencia a insulina. Además, los elevados niveles de glucosa y ácidos grasos causan estrés oxidativo y daño a las células endoteliales perpetuando aún más la inflamación en el tejido adiposo. Adaptado de (Wellen and Hotamisligil 2003).

### 3.4. Producción excesiva de glucosa en hígado, gluconeogénesis

La homeostasis anormal de la glucosa que produce hiperglucemia en pacientes con DM2 es consecuencia de muchas alteraciones metabólicas como se ha visto a lo largo de esta introducción: un defecto en la secreción de insulina, resistencia a insulina en hígado, músculo y tejido adiposo y por un defecto en la captación y un aumento de la síntesis de glucosa. El flujo aumentado de glucosa desde el hígado puede derivar tanto de la glucogenólisis como de la gluconeogénesis como de ambas. Sin embargo, sólo la gluconeogénesis parece aumentar proporcionalmente con la severidad del estado diabético, mientras que la tasa de glucogenólisis puede ser equivalente a la de un individuo sano (Wahren and Ekberg 2007).

Tanto un defecto en la captación de glucosa a nivel periférico como la elevada producción de glucosa a partir de gluconeogénesis que se produce durante la DM2 son los responsables de los niveles altos de glucosa que presentan estos pacientes en ayunas, lo que se conoce como IFG, anteriormente definida. Dada la importancia de esta condición del paciente en ayunas se dedicará un capítulo a la comprensión de la regulación de la glucemia en ayunas.





## 4. METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN AYUNAS

### 4.1. Glucólisis y gluconeogénesis

La homeostasis de la glucosa refleja un balance entre la producción hepática de glucosa y su captación y utilización a nivel periférico. La insulina es el regulador más importante para este equilibrio metabólico, pero la señalización neural, señales metabólicas y otras hormonas como por ejemplo el glucagón resultan en el control integrado para el abastecimiento en glucosa y su utilización. **En ayunas**, los bajos niveles de insulina aumentan la producción de glucosa al promover la gluconeogénesis hepática y la glucogenolisis y reducen la captación de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina como son el músculo esquelético y la grasa. De este modo se promueve la movilización de precursores almacenados como aminoácidos, lactato, glicerol y piruvato. El glucagón, secretado por las células  $\alpha$ -pancreáticas cuando los niveles de glucosa sanguínea o insulina son bajos, estimula la glucogenolisis y gluconeogénesis por parte del hígado y la médula renal (Powers 2016) (figura 14A).

En realidad, el primer aporte sustancial de glucosa después del ayuno proviene de la **glucogenolisis** hepática. Puesto que el glucógeno se consume rápidamente entre las primeras 2- 6 horas de ayuno y decrece progresivamente después de las 12-40 horas de ayuno, entra en juego un segundo aporte proveniente de la **gluconeogénesis** capaz de mantener la homeostasis de la glucosa a partir de las 12-40 horas pudiendo llegar a ser máximo a las 60 horas de ayuno (Wahren and Ekberg 2007). En el proceso de glucogenolisis, el hígado supe las necesidades de glucosa del cuerpo rompiendo el glucógeno en glucosa-6-fosfato, que seguidamente es hidrolizada por la glucosa 6 fosfatasa (G6PC) en glucosa libre. Por otra parte, la gluconeogénesis es la *síntesis de novo* de glucosa, consistente en la formación de glucosa 6 fosfato desde precursores como lactato, glicerol y aminoácidos como la alanina que posteriormente son hidrolizados por la G6PC a glucosa libre (Raddatz and Ramadori 2007) (figura 14A).

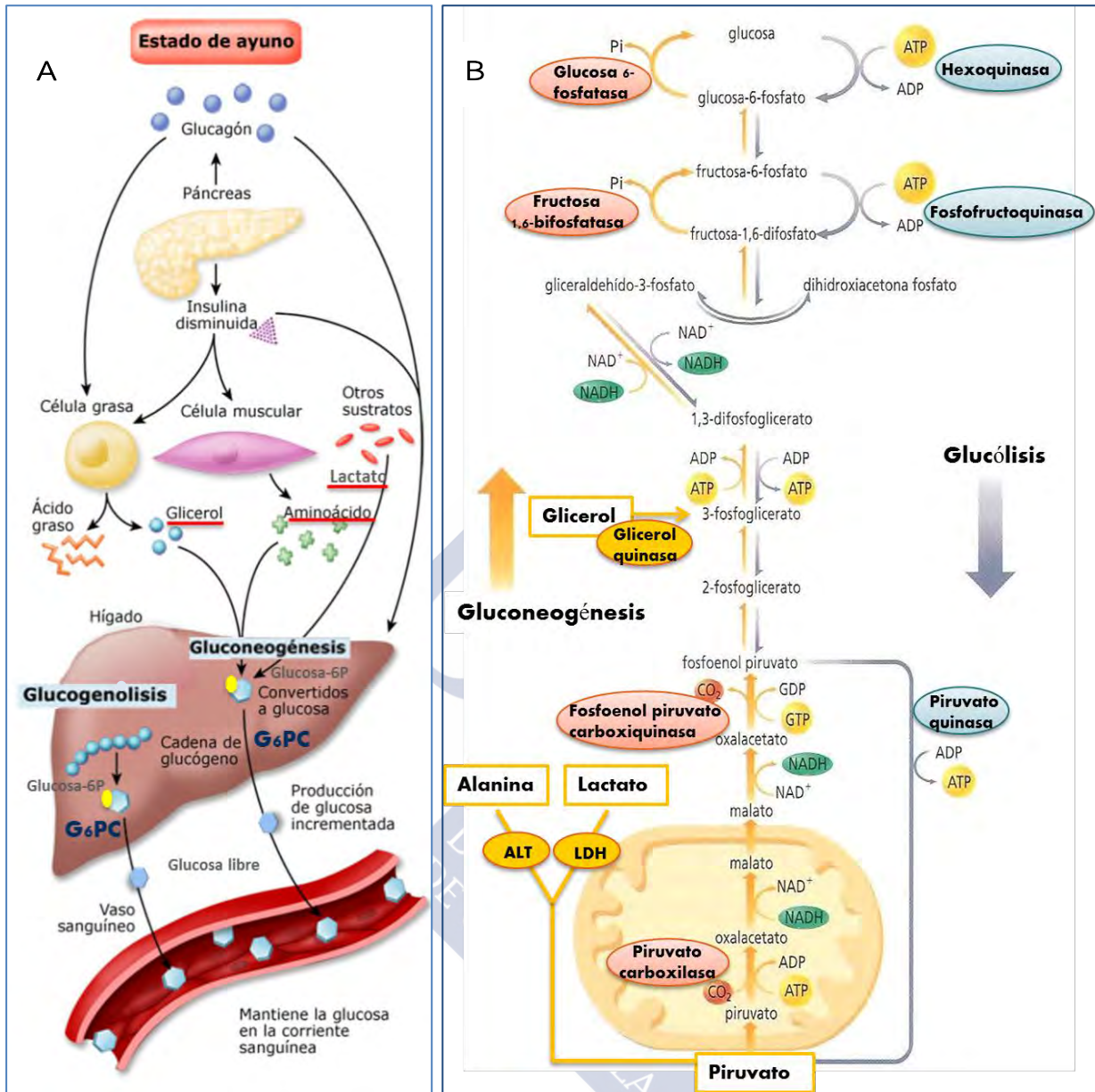


FIGURA 14. Producción de glucosa por el hígado durante condiciones de ayuno (gluconeogénesis y glucogenólisis). A. Durante el ayuno los niveles elevados de glucagón y bajos de insulina desencadenan la gluconeogénesis y glucogenólisis. Adaptada de (Diabetes Teaching Center at the University of California 2007). B. Gluconeogénesis y glucólisis, enzimas más relevantes y sustratos. Se indican únicamente las enzimas que son distintas en ambos procesos. Adaptada de (Marquez 2012).

## 4.2. Regulación de la gluconeogénesis

La gluconeogénesis es el proceso crítico llevado a cabo por el hígado para mantener los niveles de glucosa sanguínea en un rango normal durante situaciones de ayuno prolongado. Además del hígado, sólo el riñón presenta capacidad para realizar la gluconeogénesis

aunque también se ha propuesto en algunos estudios al intestino de rata (Mithieux, Rajas et al. 2004). Aunque es el proceso contrario a la glucólisis, ambas rutas están estrechamente reguladas y algunas de sus enzimas son compartidas por los dos procesos. La tasa de gluconeogénesis se controla por la activación transcripcional de las enzimas unidireccionales presentes en esta ruta, como la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK), preferentemente en su forma citosólica (PCK1), por la fructosa 1,6-bifosfatasa (F1,6BPasa) y glucosa-6-fosfatasa (G6PC), ya que solamente estas enzimas tienen distintos sustratos en gluconeogénesis y glucólisis (Pilkis, el-Maghrabi et al. 1988) (figura 14B). La regulación transcripcional de estas enzimas se produce tanto en una situación de ayuno activándola, como después de la ingesta reprimiéndola. También son clave otras formas de regulación de la gluconeogénesis como la ejercida por cantidad de sustrato sobre la enzima bifuncional, que se describirá más adelante.

#### 4.2.1. Activación de la gluconeogénesis en ayuno: GLUCAGÓN y CORTISOL

Bajo condiciones de ayuno, hormonas catabólicas como glucagón y cortisol interaccionan con sus receptores de membrana específicos y éstos a su vez se acoplan a la proteína adenilato ciclasa (AC). Esta enzima cataliza la conversión de adenosina trifosfato (ATP) a adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (Pilkis, el-Maghrabi et al. 1988, Raddatz and Ramadori 2007). El AMPc actúa como un segundo mensajero que promueve la activación de la vía de señalización de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA), y esta vía es la principal responsable de la activación por fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico (**CREB**, *cAMP response element-binding*). CREB fosforilado junto con sus coactivadores CBP/p300 (CBP, *CREB binding protein*) y CRTC2 (CRTC2, *CREB regulated transcription co-activator 2*) interaccionan para dar lugar a la activación transcripcional de genes gluconeogénicos (Puigserver, Rhee et al. 2003, Winzell and Ahrén 2004). La presencia del elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE, *cAMP Response Element*) en los promotores de PEPCK, G6Pasa, F1,6BPasa, y piruvato carboxilasa (PC) confirma que la unión de CREB y sus coactivadores puede activar directamente la transcripción de estos genes. Interesante es además que el complejo fosfoCREB-CBP/p300 activa la transcripción del co-activador 1  $\alpha$  del receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas

(**PGC1- $\alpha$** , *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), que a su vez actúa como factor de transcripción de genes gluconeogénicos para amplificar la magnitud de la respuesta gluconeogénica (Oh, Han et al. 2013) (figura 15).

Además de CREB, **FOXO1** (*Forkhead box protein O1*) constituye el otro regulador transcripcional de la gluconeogénesis en ayuno y se regula fundamentalmente por la falta de señalización de la vía de insulina/AKT en el hígado. La actividad transcripcional de FOXO1 se estimula altamente por su coactivador PGC-1 $\alpha$ , por lo que esto podría indicar que se trata de un vía crítica en la fase tardía de la respuesta adaptativa a ayuno. Así, el complejo formado por FOXO1, PGC1- $\alpha$  y otros factores de transcripción como el factor nuclear de hepatocitos (HNF4, *Hepatocyte Nuclear Factor*) pueden promover la gluconeogénesis a través de su unión al elemento de respuesta a insulina (IRE, *Insulin Response Element*) que ha sido situado en los promotores de genes como G6PC y PCK1 (Oh, Han et al. 2013) (figura 15).

#### 4.2.2. Inhibición de la gluconeogénesis después de la ingesta: INSULINA

Después de la ingesta de alimentos, la terminación de la gluconeogénesis hepática se alcanza por la inhibición transcripcional desencadenada por la señalización de la hormona anabólica insulina. Esto se produce gracias a la inactivación de activadores transcripcionales/coactivadores promovida por modificaciones post-traduccionales o por la activación de represores de genes gluconeogénicos. Un ejemplo de un represor de la transcripción es TCF7L2 (TCF7L2, *Transcription factor 7-like2*) (Oh, Han et al. 2013). En un estado postprandial, cuando los niveles de insulina son elevados, se desencadena la activación por fosforilación de AKT, una proteína clave para la señalización de la insulina que se encuentra *downstream* del receptor de insulina (IR, *Insulin Receptor*) y de su sustrato (IRS1, *Insulin Receptor Substrate 1*). La activación de AKT tiene como consecuencia la inhibición de la transcripción de genes gluconeogénicos y esta inhibición es mediada por la localización celular de sustrato *downstream* FOXO1. FOXO1 es fosforilado en Thr24 y Ser256 por AKT en el núcleo y así se promueve su exportación desde el núcleo hacia el citoplasma donde permanece retenido por unión a proteínas como 14-3-3 y no puede desencadenar la transcripción de los genes G6PC y PCK1 (Brunet, Bonni et al. 1999, Guertin, Stevens et al. 2006) (figura 15). Otra posibilidad es que la insulina a través de la activación de



AKT, conduzca a la fosforilación inactivante o degradatoria de TRTC2 impidiendo también la transcripción de PEPCK y G6PC (Altarejos and Montminy 2011).

#### 4.2.3. Otros tipos de regulación de la gluconeogénesis: la enzima bifuncional

Otra de las enzimas claves en la regulación del metabolismo de la glucosa es la enzima bifuncional: fosfofructoquinasa 2/fructosa 2,6-bisfosfatasa (PFK2/F2,6BPasa). Las actividades de la PFK1 (glucólisis) y la F1,6BPasa (gluconeogénesis) en hígado están principalmente reguladas por los niveles del sustrato fructosa 2,6 bifosfato (**F2,6P**) (activa a PFK1 e inhibe a F1,6BPasa). A su vez, los niveles de F2,6P están controlados por la enzima bifuncional (PFK2/F2,6BPasa) que se regula por insulina, glucagón, adrenalina... En ayunas, el glucagón desencadena la señalización por AMPc que se traduce en la activación del brazo F2,6BPasa del enzima bifuncional y esto tiene como consecuencia el aumento en la actividad de la F1,6BPasa permitiendo que la gluconeogénesis tenga lugar mientras se inhibe la glucólisis.

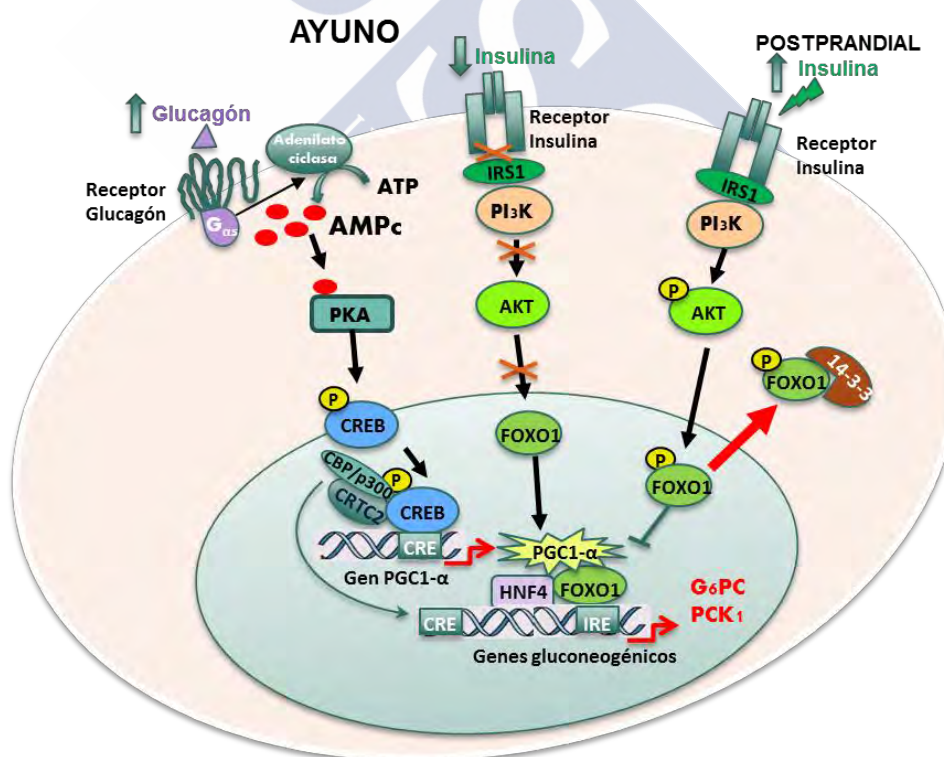


FIGURA 15. Activación transcripcional de genes gluconeogénicos. Se muestra la activación en ayunas de genes gluconeogénicos mediada por el glucagón y glucocorticoides a través de la señalización de AMP cíclico y por la ausencia de señalización de la insulina. Se muestra también la inhibición de genes gluconeogénicos en etapa postprandial mediada por la insulina a través de la señalización de AKT. Adaptado de (Puigserver, Rhee et al. 2003, Raddatz and Ramadori 2007, Altarejos and Montminy 2011, Wondisford, Xiong et al. 2014).

### 4.3. El enzima AKT y la regulación de la gluconeogénesis

#### 4.3.1. Estructura de AKT

AKT/PKB (PKB, Proteína quinasa B) es una serina/treonina quinasa que constituye un regulador clave en un amplio rango de funciones fisiológicas incluyendo metabolismo, proliferación, supervivencia, crecimiento, angiogénesis y migración e invasión. Desde su identificación inicial como protooncogén, AKT ha destacado por su importancia como el mayor efector *downstream* de la vía de PI3K. La familia de proteínas quinasa AKT comprende tres isoformas altamente relacionadas codificadas por tres genes diferentes: *AKT1* (*PKB $\alpha$* ), *AKT2* (*PKB $\beta$* ) y *AKT3* (*PKB $\gamma$* ) que comparten un 80% de identidad de secuencia y una arquitectura común compuesta por un dominio catalítico flanqueado por un dominio N-terminal de homología pleckstrina (PH, *Pleckstrin Homology*) y un dominio C-terminal. Las interacciones a nivel del dominio quinasa PH son claves para mantener a AKT en el estado activo y además es el responsable de la unión a fosfatidilinositoles posibilitando la transmisión de la señalización proveniente de receptores tirosina quinasa (Toker and Marmiroli 2014) (figura 16).

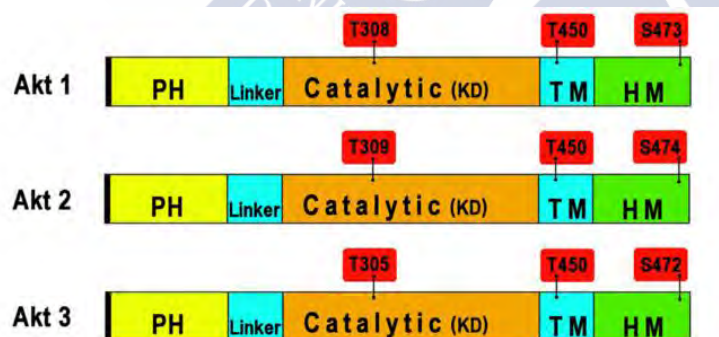


FIGURA 16. Estructura de las isoformas de AKT. Todas las isoformas de Akt poseen un dominio catalítico (KD), flanqueado por un dominio amino-terminal PH y por un dominio regulador en el extremo C-terminal. Se muestran en rojo los sitios de fosforilación. Adaptado de (Toker and Marmiroli 2014).

#### 4.3.2. Activación de AKT

Las tres isoformas presentan un mecanismo de activación con una secuencia común. Tras la activación de receptores tirosina quinasa (RTK) en respuesta a factores de crecimiento como la insulina, la PI3K fosforila a una serie de fosfoinositidos generando

polifosfoinosítidos PIP3 (PtdIns (3,4,5)P3) y PIP2 (PtdIns (3,4)P2) que son capaces de unirse al dominio PH de AKT. Esta unión provoca la relocalización de AKT hacia la membrana donde es favorable su fosforilación a nivel de dos sitios regulatorios: Thr308 en el dominio catalítico y Ser473 en el dominio hidrofóbico. La fosforilación a nivel de Thr308 es mediada por la quinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1, *Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*) de forma dependiente de PIP3 y PIP2. En cambio, la fosforilación de AKT en Ser473 en respuesta a factores de crecimiento se atribuye a mTORC2 (mTORC2, *Rictor-Mtor complex 2*). mTORC2 junto con mTORC1 constituyen los complejos proteicos a través de los que opera la serina/treonina quinasa mTOR, una proteína de 289-kDa que pertenece a la familia de las PI3K (Garc and Alessi 2008, Toker and Marmiroli 2014) (figura 17).

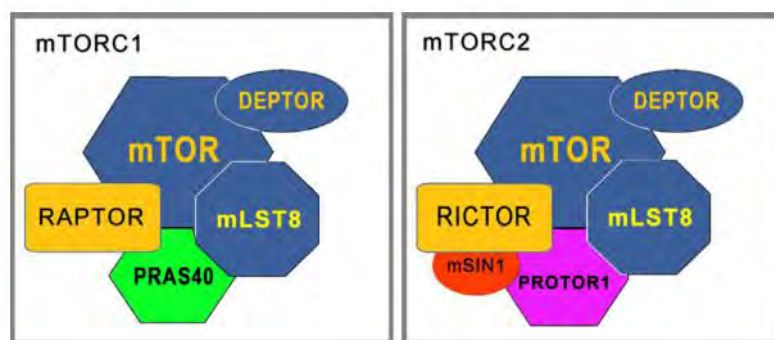


FIGURA 17. Componentes de los dos complejos de los que forma parte mTOR. mTORC1 se compone de mTOR, mLST8, raptor y PRAS40, y es sensible a rapamicina. Además de mLST8, el complejo insensible a rapamicina mTORC2 contiene a mTOR en asociación con rictor, mSIN1 y PRR5 (Garc and Alessi 2008).

Algunos autores han indicado que mTORC2, y no mTORC1, juega un papel crucial en la fosforilación y activación de SGK1 (SGK1, *Serum- and Glucocorticoid-induced protein Kinase 1*) un miembro de la familia de quinasas AGC (AGC, *protein kinase A/protein kinase G/protein kinase C*) y se estimula bajo la acción de factores de crecimiento, entre ellos la insulina, conduciendo a la fosforilación de diversos sustratos como FOXO, el cual estaría regulado por SGK1. La fosforilación de FOXO se reduce en células deficientes en mTORC2. mTORC2 puede regular a AKT fosforilándola directamente en el sitio del motivo hidrofóbico Ser473 o través de la fosforilación que ejerce sobre SGK1 la cual se une a PDK1 para permitir que esta última fosforile a AKT en su residuo Thr308 (Guertin, Stevens et al. 2006). Un indicador de la actividad de mTORC2 lo constituye un sustrato de SGK1 denominado NDRG1 cuya

fosforilación en Thr346, Thr356 y Thr366 depende de la presencia de mTORC2. Una vez activada AKT, a través de sus dos sitios de fosforilación y activación se redistribuye a otras localizaciones subcelulares donde fosforila a proteínas diana que contienen el motivo adecuado, entre ellas FOXO1, encargado de la regulación de la expresión de genes gluconeogénicos (Garc and Alessi 2008) (figura 18).

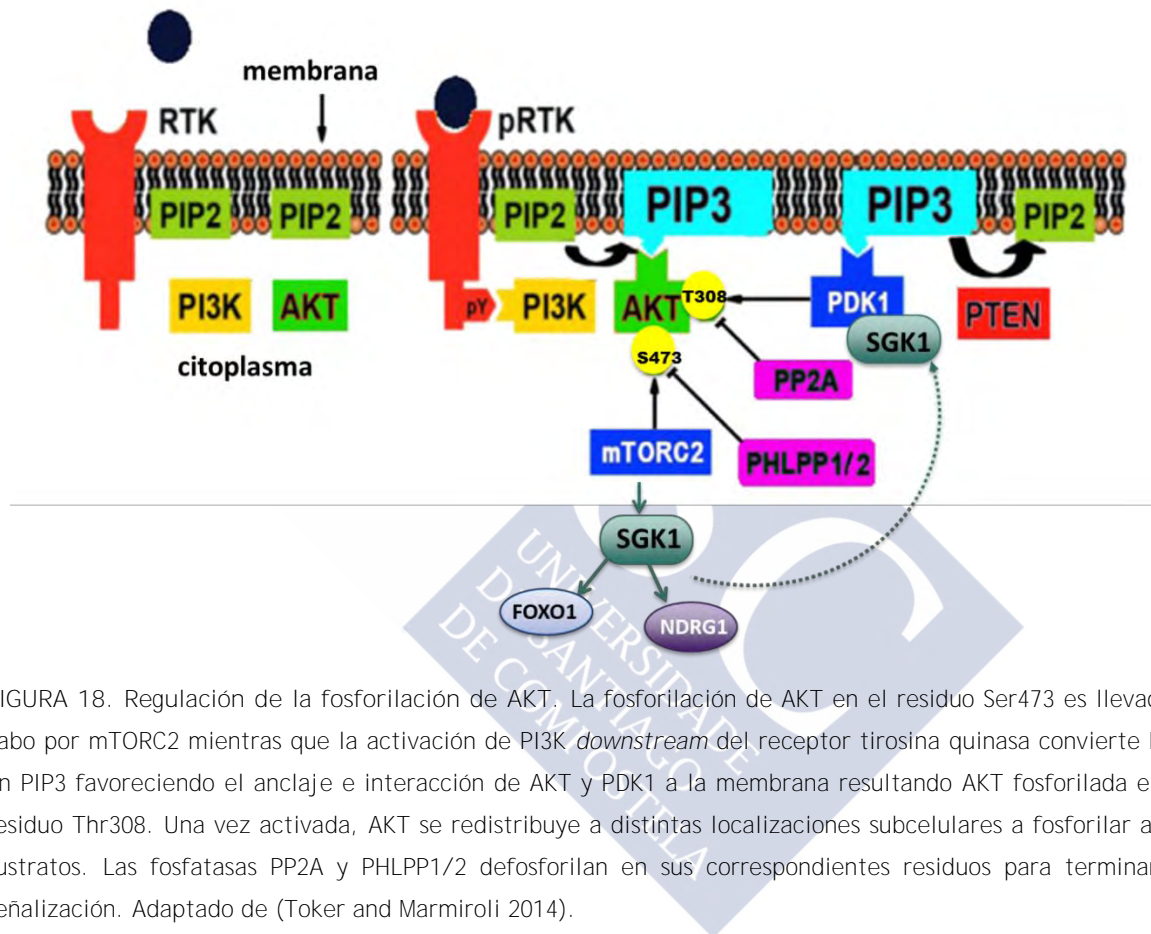


FIGURA 18. Regulación de la fosforilación de AKT. La fosforilación de AKT en el residuo Ser473 es llevada a cabo por mTORC2 mientras que la activación de PI3K *downstream* del receptor tirosina quinasa convierte PIP2 en PIP3 favoreciendo el anclaje e interacción de AKT y PDK1 a la membrana resultando AKT fosforilada en su residuo Thr308. Una vez activada, AKT se redistribuye a distintas localizaciones subcelulares a fosforilar a sus sustratos. Las fosfatasas PP2A y PHLPP1/2 defosforilan en sus correspondientes residuos para terminar su señalización. Adaptado de (Toker and Marmiroli 2014).

#### 4.3.3. Inactivación de AKT

La inactivación de AKT se lleva a cabo por medio de proteínas fosfatasas como PP2A (lleva a cabo la defosforilación del sitio Thr308) y la PHLPP (PHLPP, *PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase*, se encarga de la defosforilación del sitio Ser473). También PTEN (PTEN, *Protein Phosphatase and Tensin Homolog*), consigue la inactivación de AKT a través de la defosforilación de PIP3 a PIP2 (Toker and Marmiroli 2014).



## 5. EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL PAPEL DE LAS QUINASAS DE ESTRÉS COMO HIPÓTESIS UNIFICADORA PARA EXPLICAR LA RESISTENCIA A INSULINA Y LA DM2

### 5.1. Estrés oxidativo

Hemos visto que la resistencia a insulina inducida por obesidad es un desorden metabólico complejo que precede al desarrollo de la DM2 y que es imposible de explicar a través de un único factor etiopatológico. Como indicamos abarca varios factores como el desorden del metabolismo lipídico, la inflamación y el estrés ER. Algunos autores proponen al estrés oxidativo como un potencial mecanismo unificador para explicar todos los factores de estrés que conducen a resistencia a insulina y al desarrollo y progresión hacia la DM2 (Evans, Goldfine et al. 2002, Eriksson 2007, Yang, Jin et al. 2011).

El estrés oxidativo indica la acumulación intracelular de **especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species)**. Las principales son: el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), superóxido ( $\cdot O_2^-$ ), hidroxil ( $\cdot OH$ ), peroxil ( $\cdot RO_2^-$ ) y hidroperoxil ( $\cdot HO_2^-$ ). En la respiración mitocondrial, las ROS se generan en la cadena de transporte de electrones como un subproducto en el proceso de fosforilación oxidativa. Esto ocurre por ejemplo en situaciones de elevada oxidación de sustratos energéticos como la glucosa y los ácidos grasos. Se han presentado evidencias que sugieren que bajo las condiciones que causan resistencia a insulina (inflamación, lipotoxicidad, glucotoxicidad y algunos mediadores endocrinos) se produce una excesiva formación de ROS y éstos afectan a las células diana de la insulina, en particular, a los adipocitos: por un lado, los elevados niveles de glucosa causarían estrés oxidativo debido a la elevada producción de ROS mitocondrial, a la glicación no enzimática de proteínas y a la autooxidación de glucosa, por otro, la elevación en los niveles de ácidos grasos causaría estrés oxidativo debido al aumento del desacoplamiento mitocondrial y a la  $\beta$ -oxidación (Evans, Goldfine et al. 2002).

Como hemos visto, diversos factores característicos de la resistencia a insulina, como hiperglucemia e hiperlipidemia resultan en la generación de ROS y en los últimos años se han identificado 5 mecanismos concretos por los cuales esto ocurre: (1) flujo de la vía del

poliol, (2) elevada formación de productos de glicación avanzada (AGEs, *Advanced Glycation End products*), (3) expresión aumentada del receptor para AGEs (RAGE), (4) activación de varias isoformas de PKC y (5) hiperactivación de la vía de hexosaminas. Además, el estrés oxidativo que se genera en pacientes con DM2 se ve agravado por la inactivación de enzimas como la óxido nítrico sintasa endotelial con la consecuente generación de especies reactivas de nitrógeno (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) y las complicaciones cardiovasculares asociadas que ello genera (Franco, Domenico et al. 2011). Todos estos mecanismos que generan estrés oxidativo acaban dando lugar a la activación de vías de señalización MAPK sensibles a estrés como las p38MAPK y JNK, así como la alteración de vías de señalización en las que está implicado el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B, *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) y también de ciertas isoformas de PKC. Estas rutas tienen en común la habilidad directa o indirecta para desencadenar cascadas de señalización con fosforilaciones en serina. Existe un elevado número de dianas potenciales de estas quinasas en la ruta de señalización de la insulina, incluyendo el receptor de insulina (IR) y el sustrato del receptor de insulina (IRS1). El incremento de fosforilación de IR o IRS1 en lugares serina/treonina disminuye la posibilidad de fosforilación en lugares de tirosina, y ello va en detrimento de la transmisión de señal de la insulina (Wellen and Hotamisligil 2005, Eriksson 2007) (figura 19). Las formas de IRS1 fosforiladas en serina/treonina son menos capaces de asociarse con las moléculas efectoras por debajo del receptor de insulina, específicamente, la PI3K, impidiendo la acción de la insulina y por tanto la activación de AKT y el transporte de glucosa (Evans, Goldfine et al. 2002). Además, los productos de los genes que se activan por estas estas vías de estrés causan daño celular y son en último lugar los responsables de las complicaciones derivadas de la DM2, de la resistencia a insulina y del defecto en su secreción por el daño causado a las células  $\beta$  (Tangvarasittichai 2015). Por ello, las quinasas de estrés adquieren un elevado protagonismo en cuanto a la regulación de la homeostasis de la glucosa y pueden constituir herramientas muy útiles para el tratamiento de la resistencia a insulina. En base a ello, antioxidantes como la vitamina C, ácido lipoico  $\alpha$  (LA, *Lipoic Acid*), vitamina E y glutatión, podrían ser claves en la prevención de la activación de estas vías (Evans, Goldfine et al. 2002, Karasu 2010).

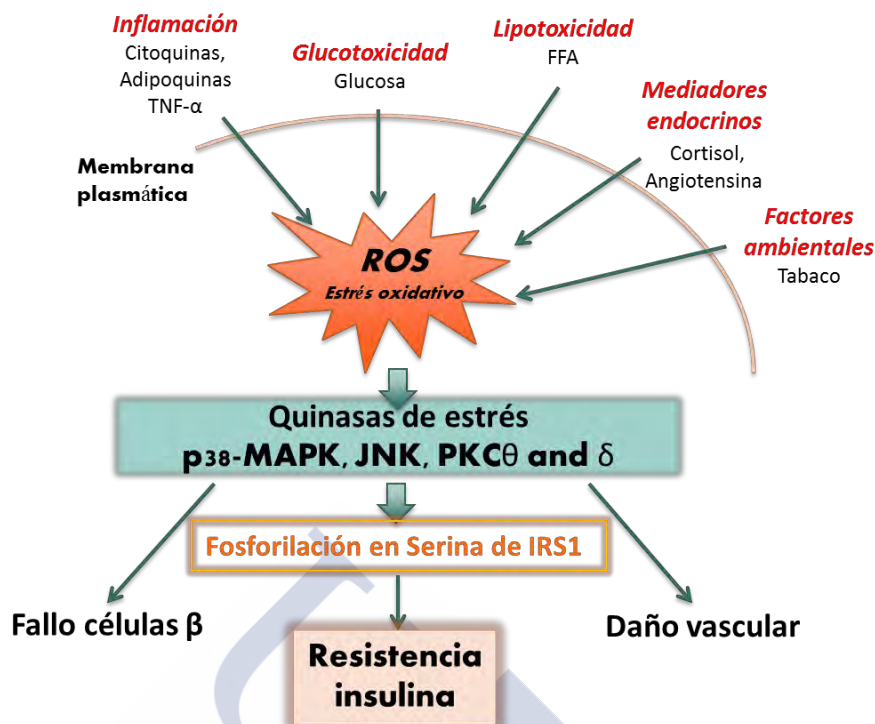


FIGURA 19. ROS y estrés oxidativo como mecanismo unificador para explicar la resistencia a insulina. Varios factores ejerciendo estrés celular se consideran causantes de la resistencia a insulina a través de la producción de ROS y la generación de estrés oxidativo. Adaptado de (Eriksson 2007).

## 5.2. Vías activadas por estrés oxidativo y quinazas de estrés

### 5.2.1. NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que juega un papel crítico tanto en la mediación de la respuesta inmune e inflamatoria como en la apoptosis. La regulación aberrante de NF- $\kappa$ B se asocia con un elevado número de enfermedades crónicas como la diabetes y la arteriosclerosis. Se activa a través de una vía consistente en la degradación de su subunidad inhibitoria I $\kappa$ B mediada por proteasoma. La enzima que fosforila I $\kappa$ B para su degradación es I $\kappa$ B quinasa (IKK), un complejo heterotrimérico consistente en dos subunidades catalíticas, IKK $\alpha$  (IKK1), IKK $\beta$  (IKK2) y una subunidad reguladora IKK $\gamma$ . NF- $\kappa$ B puede activarse por estímulos exógenos y endógenos incluyendo hiperglucemia, niveles elevados de ácidos grasos y ROS, TNF- $\alpha$ , IL-6 y otras citoquinas proinflamatorias, por la unión de AGE a RAGE, p38 MAPK, daño a DNA, infecciones virales y radiación ultravioleta. Se cree que la activación de NF- $\kappa$ B es el primer evento de señalización que se desencadena con el estrés oxidativo inducido por elevados niveles de glucosa, y posteriormente se produce la activación de otras

vías que conducen a disfunción y daño celular. La generación de ROS y el descenso de las defensas antioxidantes debido a un aumento de ácidos grasos libres también conduce a la activación de NF- $\kappa$ B por medio de la quinasa PKC $\theta$  (como se mencionaba anteriormente, se ve activada por el aumento en derivados de ácidos grasos como DAG) (Evans, Goldfine et al. 2002).

### 5.2.2. MAPK

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, la señalización de las cascadas MAPK transduce una gran variedad de señales extracelulares que regulan respuestas celulares. De los tres grupos identificados (ERKs, p38 MAPKs y JNK) las ERKs se activan fundamentalmente por mitógenos y señales de diferenciación mientras que JNK y p38 MAPK se activan por estímulos de estrés incluyendo hiperglucemia, ROS, estrés oxidativo u osmótico, citoquinas proinflamatorias, choque térmico y radiación ultravioleta. Se les conoce con el término general de proteína quinasas activadas por estrés (SAPK, *Stress Activated Protein Kinases*). La familia SAPK se compone de cuatro isoformas de p38 (p38 $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ ) y tres isoformas de JNK (JNK1,2,3). Aunque ambas p38 y JNK se han implicado en obesidad y resistencia a insulina, la más caracterizada en este sentido es JNK (Manieri and Sabio 2015).

- **JNK.** JNK1 y JNK2 se expresan ubicuamente mientras que JNK3 se expresa en cerebro. Cada una de ellas presenta algunas variantes de *splicing*. Las JNK activadas se unen y fosforilan al factor c-Jun, que una vez fosforilado se une a otros miembros de la familia c-Jun y de la familia c-Fos para formar el factor de transcripción conocido como proteína activadora-1 (AP-1). A través de la fosforilación de sus sustratos, las JNKs inducen respuestas celulares a distintos estímulos, como la apoptosis, proliferación y migración celular. JNK1 y JNK2 también se han descrito específicamente como reguladores durante la inflamación mediada por obesidad y en desórdenes metabólicos en respuesta estrés oxidativo mediado por hiperglucemia. La falta general de JNK1 puede conducir a un incremento del gasto energético, una menor acumulación ectópica de lípidos y protección frente a la resistencia a insulina. Bajo la activación de citoquinas proinflamatorias (p.ej. TNF- $\alpha$ ) y ácidos grasos libres, JNK1 fosforila a IRS1 en la serina 307, previniendo la interacción de la insulina con su

receptor (Samuel and Shulman 2012, Manieri and Sabio 2015). No obstante, estudios con mutantes tejido-específicos revelaron que las funciones de JNK pueden variar en función del tejido y pueden modular la resistencia a insulina y la esteatosis hepática a través de distintas acciones moleculares e incluso de forma opuesta. Así por ejemplo, la eliminación específica de JNK1 en hígado de ratones producía intolerancia a glucosa, resistencia a insulina y esteatosis hepática en contraposición con lo encontrado para los mutantes específicos de tejido adiposo en los que la falta de JNK1 conseguía reducir la resistencia a insulina inducida por una dieta alta en grasa mediante una disminución en la producción de IL-6 (Sabio, Das et al. 2008, Sabio, Cavanagh-Kyros et al. 2009).

- **p38 MAPK.** Las cuatro isoformas de p38 son codificadas por distintos genes y tienen distintos patrones de expresión en función del tejido. p38- $\alpha$  es la más ampliamente expresada excepto por el cerebro donde predomina mayoritariamente la isoforma p38- $\beta$ . Todas las isoformas de p38 se activan en respuesta a estímulos apropiados y se pueden activar también en condiciones anómalas que cursen con hiperglucemia. Aunque el papel de esta quinasa de estrés en metabolismo no está bien definido, se sabe que p38- $\alpha$  fosforila algunas proteínas clave implicadas en el metabolismo lipídico y de la glucosa. Algunas de sus dianas *downstream* son importantes factores de transcripción implicados en gluconeogénesis como PGC1- $\alpha$  y CREB en hígado. Así, un aumento de la señalización por p38- $\alpha$  aumentaría mediante fosforilación las actividades de PGC1- $\alpha$  y CREB favoreciendo su unión a las regiones promotoras de los genes gluconeogénicos PEPCK y G6PC para promover su transcripción contribuyendo aún más al estado hiperglucémico (Puigserver, Rhee et al. 2001, Manieri and Sabio 2015). Además, la activación de p38 también influye en procesos de inmunidad, crecimiento celular y apoptosis e induce respuestas tejido-específicas a estrés que influyen en la regulación génica e inflamación mediada por NF $\kappa$ B que en último lugar también produce alteraciones sobre la sensibilidad a insulina. No obstante, para poder definir mejor el papel metabólico de p38 en cada tejido serían necesarios más estudios con ratones *knockout* condicionales para cada una de las isoformas de p38.

### 5.2.3. PKC

Como ya se mencionaba anteriormente, las elevadas concentraciones de DAG constituyen un activador alostérico de la quinasa de estrés PKC, más específicamente de PKC $\theta$ . Se ha visto en células endoteliales que la actividad aumentada de PKC proveniente de un estado crónico de hiperglucemia genera unos niveles elevados de ROS y ello se asocia con muchos procesos implicados en la patología de las complicaciones diabéticas tales como la regulación de la permeabilidad vascular, el flujo sanguíneo y la neovascularización. Además, la activación de PKC por hiperglucemia y ROS es sinérgica con otras vías como la de las MAPK empeorando más la situación (Evans, Goldfine et al. 2002).

### 5.2.4. SOK1 como regulador negativo del metabolismo de glucosa y grasa

SOK1 es una quinasa de estrés que se ha relacionado ampliamente con estrés oxidativo y procesos de muerte celular asociados, aunque recientemente se le ha encontrado un papel en estrés metabólico. Los primeros datos acerca de SOK1 y metabolismo fueron mostrados por Nerstedt et al y demostraron que la eliminación parcial de SOK1 mediante RNA interferente en células de rata incrementaba la oxidación lipídica y mejoraba la captación de glucosa estimulada por insulina. Desarrollaron experimentos que revelaron que ambos efectos podrían estar causados respectivamente porque los bajos niveles de SOK1 correlacionan con un aumento en la expresión de la proteína desacoplante 3 (UCP3, *Mitochondrial Uncoupling Protein 3*) y a una disminución en la de los transportadores de glucosa Glut1 (Slc2a1, *Solute carrier family 2 member 1*), Glut4 (Slc2a4, *Solute carrier family 2 member 4*) y la enzima hexoquinasa 2 (HK2, *hexokinase 3*) que se encarga de transferir fosfato a la glucosa en músculo. De forma concordante con estos resultados este grupo observó que la expresión de SOK1 estaba incrementada en el músculo esquelético de pacientes con diabetes tipo 2 (Nerstedt, Cansby et al. 2012). De esta forma establecieron por primera vez para SOK1, un papel como regulador negativo de la homeostasis de la glucosa y de la sensibilidad a insulina a nivel sistémico. Para corroborar este hallazgo, dentro del mismo grupo Cansby et al generaron un ratón transgénico que sobreexpresaba SOK1 y lo sometieron a una dieta alta en grasa para inducirles un estado próximo a la diabetes. Estos ratones transgénicos eran hiperinsulinémicos y presentaban resistencia a insulina e



intolerancia a glucosa. También trataron de elucidar el mecanismo por el cual estos ratones presentaban resistencia a insulina y así encontraron niveles de expresión elevados de distintas enzimas anabólicas: las que regulan la gluconeogénesis; glucosa-6-fosfatasa (*G6pc*, *glucose-6-phosphatase catalytic subunit*) y fructosa bifosfatasa 1 (*Fbp1*, *fructose-bisphosphatase*); enzimas responsables de la lipogénesis *de novo* como la ácido graso sintasa (*Fasn*, *Fatty acid synthase*); de la síntesis de glucógeno como la glucoquinasa (*Gck*, *glucokinase*) y de la síntesis de ácidos grasos como la acetil-CoA carboxilasa (*Acc*, *acetyl-CoA carboxylase*). La ACC sintetiza malonil-CoA que funciona como precursor de la síntesis de ácidos grasos y reprime la oxidación lipídica. Un descenso en la capacidad oxidativa mitocondrial se traduce en el desarrollo de resistencia a insulina sistémica (Cansby, Amrutkar et al. 2013).

Una de las características que se describía sobre la patogénesis de la diabetes era la acumulación ectópica de lípidos en el hígado. Por ello y con los resultados encontrados hasta el momento lo siguiente que se propusieron en este grupo fue tratar de descifrar los efectos de SOK1 sobre el control del metabolismo lipídico en hígado humano. Encontraron que la sobreexpresión de SOK1 en hígado induce acumulación lipídica como consecuencia de una menor  $\beta$ -oxidación y una reducción en la secreción de triglicéridos combinada con una mayor síntesis lipídica. Dichos efectos se invertían al realizar el experimento contrario de disminuir los niveles de SOK1 en hígado. El modelo que propusieron es que SOK1 se encuentra en la periferia de las gotas lipídicas de los hepatocitos y controla el reparto de triglicéridos que llevan a cabo las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs, *Very Low Density Lipoproteins*) a tejidos extrahepáticos. Las gotas lipídicas son la principal fuente de acumulación de triglicéridos que luego han de liberarse mediante lipólisis para dar lugar a ácidos grasos no esterificados (NEFAS) que pueden ser destinados a  $\beta$ -oxidación a su salida del hígado mediante VLDLs. La sobreexpresión de SOK1 conduce a una menor actividad hidrolasa sobre los triglicéridos y un menor transporte provocando que se acumulen en hígado. Lo contrario ocurre cuando se suprime la expresión de SOK1 (Amrutkar, Kern et al. 2015) (figura 20).

Estos resultados, combinados con los encontrados para músculo esquelético de pacientes con DM2 en los que la expresión de SOK1 está aumentada, indican que SOK1 contribuye a la patogénesis de la resistencia a insulina y lo hace susceptible del desarrollo de antagonistas para la intervención terapéutica en fases tempranas de la patología y de sus complicaciones asociadas (Amrutkar, Cansby et al. 2015). Los datos más recientes de este grupo también revelan una alta correlación entre los elevados niveles de SOK1 en los en biopsias de hígados de pacientes con la enfermedad hepática grasa no alcohólica (NALFD, *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) y una elevada probabilidad de que esta evolucione a esteatohepatitis no alcohólica (NASH, *Nonalcoholic Steatohepatitis*) (Amrutkar, Chursa et al. 2016).

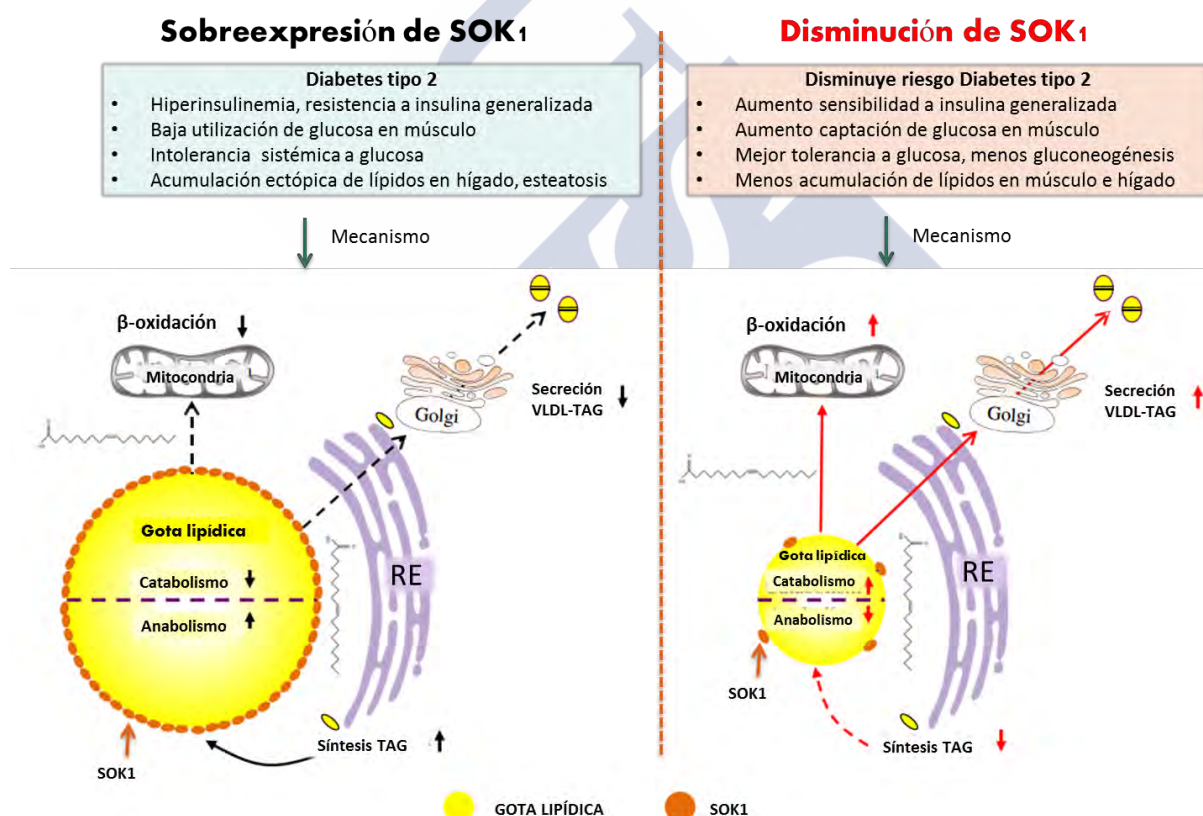


FIGURA 20. SOK1 regula el metabolismo lipídico y su sobreexpresión o inhibición puede modular la progresión hacia la diabetes tipo 2. La sobreexpresión de SOK1 reprime el catabolismo de las gotas lipídicas a las que se encuentra unido a través de la supresión de la β-oxidación y de la secreción de los triglicéridos asociados a su transportador VLDL (TAG-VLDL), y produce un aumento del anabolismo de lípidos favoreciendo DM2. La inhibición de los niveles de SOK1, por el contrario, **incrementa la β-oxidación** y la secreción de TAG-VLDL y se produce una síntesis menor de triglicéridos disminuyendo el riesgo de DM2. Adaptado de (Nerstedt, Cansby et al. 2012, Cansby, Amrutkar et al. 2013, Amrutkar, Cansby et al. 2015, Amrutkar, Kern et al. 2015).





# OBJETIVOS



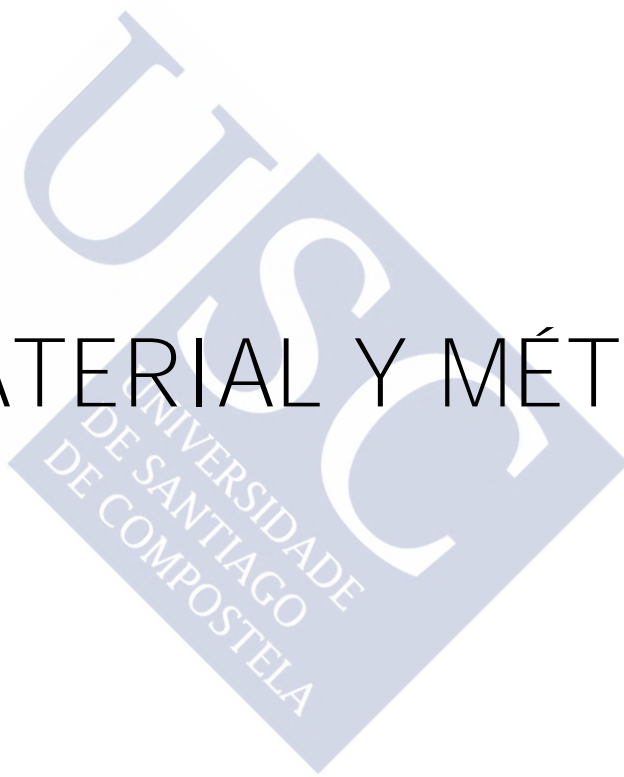
Se sabe que algunas quinasas de estrés se activan en respuesta al estrés metabólico que se genera durante el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 e intervienen en la patogenia de la resistencia a insulina. A pesar de que se conoce la importancia en estos procesos de varias familias de quinasas todavía no se entiende por completo cómo se produce la resistencia a insulina y es necesario seguir buscando nuevos mecanismos que arrojen luz sobre su patogenia.

Las GCK-III son quinasas de estrés para las que hasta hace muy poco no se les conocían efectos metabólicos. Aunque recientemente se han descrito acciones sobre el metabolismo de lípidos para SOK1, no se conocen este tipo de acciones metabólicas para las otras dos quinasas de la familia, Mst3 y Mst4, ni si esto tiene una relevancia patológica. En esta Tesis nos propusimos conocer los posibles efectos metabólicos de uno de los miembros de esta familia: Mst3. Los objetivos concretos fueron los siguientes:

- 1. Establecer un modelo *in vitro* de inhibición de Mst3 y Mst4 en el que estudiar las posibles acciones metabólicas de estas quinasas.**
- 2. Establecer un modelo *in vivo* de inhibición de Mst3 en el que estudiar las acciones metabólicas de Mst3, tanto en condiciones normales como en el desarrollo de resistencia a insulina.**
- 3. Caracterizar las consecuencias metabólicas de la falta de Mst3.**
- 4. Determinar el mecanismo por el cuál Mst3 produce alteraciones metabólicas si las hubiese.**



# MATERIAL Y MÉTODOS





## 1. CULTIVOS CELULARES

HepG2: (*Human Caucasian hepatocyte carcinoma*): esta línea celular fue aislada de la biopsia de hígado de un hombre caucásico de 15 años con un carcinoma hepatocelular bien diferenciado. Se obtuvo de la ECACC (*The European Collection of Authenticated Cell Cultures*) a través de Sigma-Aldrich. El medio utilizado para el cultivo de estas células fue Eagle's Minimum Essential Medium, Earle's Balanced Salt Solution (EMEM), (EBSS) #M2279 (Sigma-Aldrich ) suplementado con 10% v/v de suero bovino fetal (FBS, *Fetal Bovine Serum*) (Invitrogen) y 1% GPS (200 mM L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina y 10 mg/mL de estreptomycin) (Sigma-Aldrich). Estas células se mantuvieron en condiciones de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Se pasaban cuando alcanzaban la subconfluencia (70-80%) y se diluían 1:4 lo que equivale a 5 x 10,000 células/cm<sup>2</sup> usando tripsina/EDTA al 0,25% (Fisher Scientific).

HEK 293: (*Human Embryonic Kidney 293*): fueron descritas por primera vez en 1977 (Graham, Smiley et al. 1977). Se trata de células con morfología epitelial procedentes de riñón humano embrionario, que se transformaron por transfección con DNA de adenovirus de tipo 5. Esta línea celular se obtuvo de la ECACC y se cultivó en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) #D6046 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % v/v de FBS y 1% GPS. Estas células se mantuvieron en condiciones de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Se pasaban cuando alcanzaban la subconfluencia (80-90%) y se diluían 1:5 lo que equivale a 5 x 1,000 células/cm<sup>2</sup> usando tripsina/EDTA al 0,25%.

El mantenimiento, congelación/descongelación y conteo se hicieron según procedimientos estándar de cultivo celular.

## 2. TRATAMIENTOS CELULARES y FÁRMACOS

- ✓ **Insulina** (Sigma-Aldrich). Las células HepG2 se sometieron a 24 horas de serodeprivación en medio de cultivo con 1% FBS y seguidamente se trataron durante 20 minutos con una concentración 100 nM de insulina.
- ✓ **Inhibidor de PI3K, (LY294,002, Sigma-Aldrich)**. Tras 72 horas en cultivo sin cambio de medio, las HepG2 se trataron con LY294,002 10  $\mu$ M o Dimetilsulfóxido (DMSO) durante 8 horas para la determinación de niveles de expresión génica y durante 50 minutos para el análisis de proteínas.
- ✓ **Inhibidor de PKA, (H-89 dihydrochloride hydrate, Sigma-Aldrich)**. Tras 72 horas en cultivo sin cambio de medio, las HepG2 se trataron con H-89 10  $\mu$ M o DMSO durante 8 horas para la determinación de niveles de mRNA.
- ✓ **Análogo de AMPc, (N6,2'-O-Dibutyladenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt, Sigma-Aldrich)**. Tras 72 horas en cultivo sin cambio de medio, las HepG2 se trataron con este análogo de AMPc a una concentración de 1 mM durante 2 horas tanto para la determinación de niveles de expresión génica como para el análisis de proteína.
- ✓ **Inhibidor de PP2A, (Calyculin A, Discodermia calyx, Calbiochem)**. Se añadió al medio de cultivo de las células HepG2 este inhibidor de la fosfatasa a una concentración de 100 nM durante 10 minutos.

## 3. INFECCIONES LENTIVIRALES

La línea celular HepG2 se infectó con lentivirus felinos para la obtención de poblaciones estables, siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). En primer lugar, se determinó la multiplicidad de infección óptima (*MOI, Multiplicity Of Infection*) de estas células, es decir, el número de partículas de transducción lentivirales requeridas por



cada célula para que hubiera una transducción eficiente sin citotoxicidad alta. Para ello, se utilizaron lentivirus que transducían la proteína fluorescente verde GFP (*MISSION® TurboGFP Transduction Particles*, Sigma-Aldrich), obteniendo una  $MOI = 5$ . Para aumentar la eficiencia de la transducción se trató a las células previamente con bromuro de hexadimetrina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 8  $\mu\text{g/mL}$  de medio de cultivo. Además, se determinó la concentración mínima de puromicina necesaria para la selección de las células infectadas (3  $\mu\text{g/mL}$ ). (Puromicina diclorhidrato de *Streptomyces albonigerat*, Sigma-Aldrich).

Las partículas lentivirales se emplearon para silenciar la expresión de Mst3 y Mst4 por medio de un shRNA (*short hairpin RNA*): shMst3 (*STK24 MISSION shRNA Plasmid DNA serine/threonine kinase 24*) y shMst4 (*MST4 MISSION shRNA Lentiviral Transduction*). La siguiente tabla incluye las secuencias de los shRNAs seleccionados por su mayor eficiencia:

Tabla 4. Secuencia de los shRNAs de origen humano utilizados para silenciar la expresión de Mst3 y Mst4.

shRNA, número TRC	Región	Secuencia
shMst3 TRCN0000000645	CDS	CCGGTGCAGAGTTGAAGGAGAAGAGCTCGAGCTCTTCTCCTTCAACT CTGCATTTTT
shMst4 TRCN00000003191	3' UTR	CCGGCCTCTTGGTGTATAGTATTTACTCGAGTAAATACTATACACCAA GAGGTTTTT
ShControl SHC002V	Inespecífico	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCT TGTTGTTTTT

Del mismo modo, para obtener una población control se infectó un número equivalente de células con un shRNA inespecífico (*MISSION pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control*, Sigma-Aldrich).

## 4. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

### 4.1. Tranfección mediante Lipofectamina 2000

La transfección transitoria de las HepG2 se realizó con Lipofectamina 2000 (Life Technologies) siguiendo los protocolos indicados por la casa comercial. Se sembraron  $1,25 \times 10^4$  células/pocillo de  $1,9 \text{ cm}^2$  y a las 24 horas se lipofectaron con los plásmidos correspondientes a los promotores de enzimas gluconeogénicas G6PC y PEPCK (figura 21), un plásmido vacío como control y se cotransfectaron con un plásmido de control de la eficacia de transfección conteniendo la enzima  $\beta$ -galactosidasa según las cantidades que se indican en la tabla 5. Se dejaron transcurrir 24 horas más después de la transfección y se recogieron los extractos proteicos con el buffer de lisis adecuado a este tipo de ensayos (*Passive Lysis Buffer*, Promega). Las mediciones de actividad luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa se realizaron según procedimientos estándar y se determinaron sus valores de luminiscencia y absorbancia respectivamente con el analizador BERTHOLD Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader. Los sustratos utilizados para ambas enzimas fueron respectivamente Luciferina (Sigma-Aldrich), y ONPG (**2-Nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside**, Sigma-Aldrich).

Tabla 5. Se muestra los plásmidos utilizados para la transfección de las células HepG2, indicando su procedencia y las cantidades en microgramo por pocillo de  $1,9 \text{ cm}^2$ .

Plásmido	Procedencia	$\mu\text{g/pocillo } 1,9 \text{ cm}^2$
pGL3-G6P C (-3.9 kb to -21)	Cortesía de Preeti Ramadoss (Boston, Massachusetts)	0,3 $\mu\text{g}$
pGL3-PEPCK (-467 pb del promotor PEPCK de rata)	Cortesía de Preeti Ramadoss (Boston, Massachusetts)	0,05 $\mu\text{g}$
pCMV5HA-Mst3	Generado en el laboratorio mediante procedimientos estándar	0,4 $\mu\text{g}$
pCMV5HA- $\phi$	-	0,3 $\mu\text{g}$
pCMV5HA-Bgal	Clontech	0,3 $\mu\text{g}$
PBluescript	-	Hasta completar 1 $\mu\text{g/pocillo}$

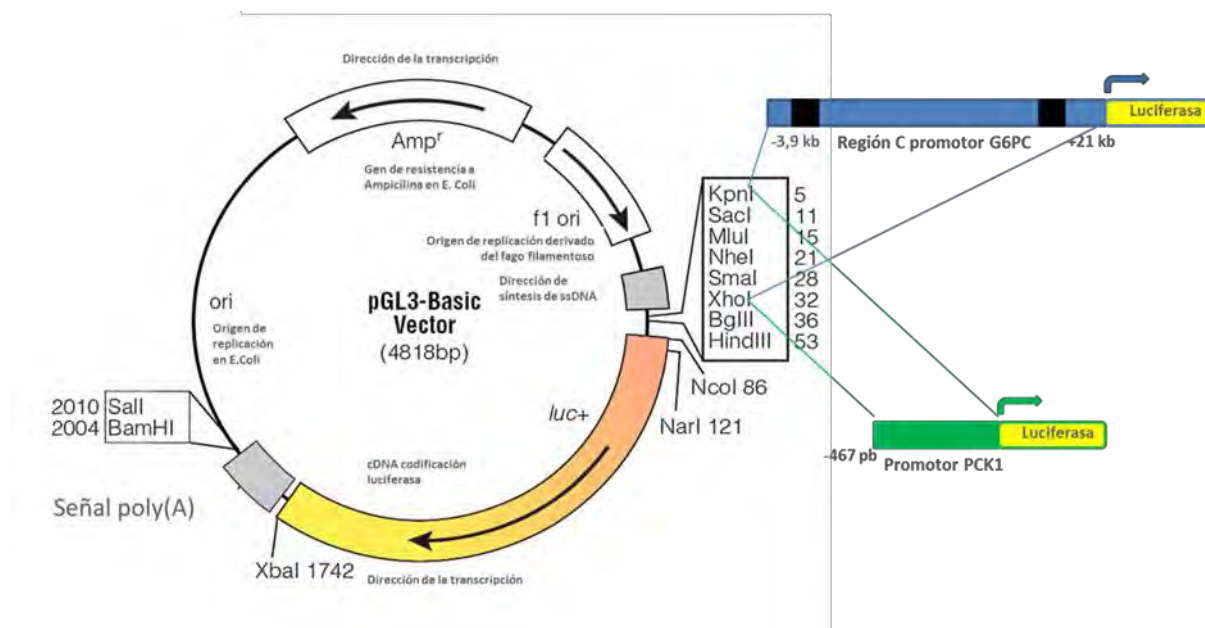


FIGURA 21. Esquema del vector pGL3 indicando el lugar de inserción de los promotores de G6PC y PCK1 en el MCS (*multicloning site*). pGL3-G6P C (-3,9 kb a +21 del promotor de G6PC) y pGL3-PEPCK (-467 pb del promotor PEPCK de rata) fueron cedidos por cortesía de Preeti Ramadoss (Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215, USA) (Ramadoss, Unger-Smith et al. 2009).

#### 4.2. Transfección mediante el método de precipitación con fosfato cálcico

Las células Hek293 se transfectaron mediante la técnica de fosfato cálcico (Wigler, Sweet et al. 1979). Se sembraron 600.000 células/placa 21 cm<sup>2</sup> y a las 24 horas cuando alcanzaron una confluencia del 80% se les cambió el medio 2 horas antes de añadir una mezcla conteniendo los plásmidos (tabla 6) según el siguiente protocolo:

- 1) Pipetear gota a gota la mezcla que contiene los ácidos nucleicos sobre el HeBS2x (**HeBS2x, HEPES-buffered saline (HeBS) solution, 2x**) (tabla 7) mientras éste se burbujea con una pipeta Pasteur, para facilitar la formación de precipitados de fosfato cálcico (cristales).
- 2) De la mezcla anterior añadir 400 µL por placa de 60mm, distribuyendo lo más homogéneamente posible y mantener en cultivo durante 16 h. De esta forma se transfecta cada placa con una cantidad total de DNA de 12 µg /placa de 21 cm<sup>2</sup>.

- 3) Tras 16 horas, retirar el medio, lavar 2 veces con PBS (PBS, *Phosphate Buffer Saline*) y añadir medio fresco. A partir de aquí, se considera el tiempo 0 horas o el momento de inicio de la transfección.
- 4) A las 48 horas de la transfección recoger el extracto proteico (ver apartado 9) y proceder con la inmunoprecipitación según se describe en el apartado 13.

Tabla 6. Se indican las cantidades en  $\mu\text{g}$  de cada plásmido y las cantidades en  $\mu\text{L}$  de los reactivos  $\text{CaCl}_2$  y HeBS2x para cada condición de la proteína que se desea sobreexpresar.

Plásmido	Control	Mst3	AKT	Mst3+AKT
pMig-w- $\Phi$	6 $\mu\text{g}$	6 $\mu\text{g}$	-	-
pCMVHA- $\Phi$	6 $\mu\text{g}$	3 $\mu\text{g}$	6 $\mu\text{g}$	3 $\mu\text{g}$
pCMVHA-Mst3	-	3 $\mu\text{g}$	-	3 $\mu\text{g}$
pMig-w-MyrAKT	-	-	6 $\mu\text{g}$	6 $\mu\text{g}$
$\text{CaCl}_2$ 0,5M	125 $\mu\text{L}$	125 $\mu\text{L}$	125 $\mu\text{L}$	125 $\mu\text{L}$
HeBS2x	250 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}$	Hasta 500 $\mu\text{L}$	Hasta 500 $\mu\text{L}$	Hasta 500 $\mu\text{L}$	Hasta 500 $\mu\text{L}$

Tabla 7. Se muestran los plásmidos utilizados para la transfección de las células Hek293, indicando su procedencia y las cantidades en  $\mu\text{g}$  por placa de 21  $\text{cm}^2$ .

Plásmido	Procedencia	$\mu\text{g}/\text{placa } 21 \text{ cm}^2$
pMig-w- $\Phi$	Marcos Ríos	Hasta completar 6 $\mu\text{g}$
pCMVHA- $\Phi$	-	Hasta completar 6 $\mu\text{g}$
pCMVHA-Mst3	Generado en el laboratorio mediante procedimientos estándar	3 $\mu\text{g}$
pMig-w-MyrAKT	Marcos Ríos	6 $\mu\text{g}$

### Composición del HeBS2x:

NaCl 0,28 M/ Hepes (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-Ethanesulfonic acid) 0,05 M/  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,5 mM. Ajustar bien el pH a 7,05 con NaOH.

## 5. AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

### 5.1. Cultivo bacteriano

Para la amplificación de estos plásmidos se transformaron bacterias de la cepa *Escherichia coli* (Subcloning efficiency DH5 $\alpha$ : F-  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1  $\lambda$ -, Invitrogen). Para el crecimiento de las bacterias se utilizó el medio LB (*Luria-Broth*) (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, cloruro sódico 1% en agua destilada). Para la selección de las bacterias transformantes, el medio se suplementó con antibiótico según la resistencia conferida por el plásmido (Ampicilina 100  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich). Las condiciones de crecimiento fueron 18h a 37°C y 225 revoluciones por minuto (rpm).

Para la preparación de placas con medio sólido se utilizó el medio LB suplementado con agar bacteriológico a una concentración de 1,5%. En estas placas, que se utilizaron para la selección de transformantes, también se añadió el antibiótico correspondiente, después de esterilizar el medio y previamente a su solidificación. Tanto el medio líquido como las placas se prepararon en condiciones de esterilidad.

### 5.2. Obtención del DNA plasmídico

Para la purificación de los plásmidos a partir del cultivo bacteriano en primer lugar se picaron colonias aisladas de las placas de LB, que se crecieron en un mini cultivo y luego se purificaron mediante la técnica denominada *miniprep* para comprobar en primer lugar su correcta secuencia (apartado 5.4):

- ✓ **Minipreps:** Para la recuperación del DNA plasmídico a pequeña escala (minipreps) se utilizó el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del midi cultivo se obtuvo un cultivo a mayor escala o midi cultivo que posteriormente se purificó mediante la técnica de *midiprep*:
- ✓ **Midipreps:** El midi cultivo se realiza en 150 mL de LB suplementado con el antibiótico correspondiente durante 18 h a 37°C y 225 rpm. Para la

recuperación del DNA plasmídico se utilizó el kit NucleoBond Xtra Midi EF (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 5.3. Cuantificación de la concentración del DNA plasmídico

Para cuantificar la concentración de los ácidos nucleicos se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), midiendo la absorbancia a 260 nm. La relación D.O. 260 nm /D.O. 280 nm permite estimar el grado de pureza de las muestras, siendo 1,8 el valor óptimo. También se comprobó la integridad del DNA plasmídico mediante gel de agarosa (se describe su realización más adelante).

### 5.4. Digestión con enzimas de restricción

Se realizaron los cortes necesarios con enzimas de restricción para la comprobar la autenticidad de los plásmidos que contenían los promotores de G6PC y PEPCK. La digestión con las enzimas de restricción KpnI y XhoI (New England BioLabs) se realizó bajo las condiciones óptimas recomendadas por las casas comerciales específicamente para cada enzima y liberaban ambos fragmentos de promotor de G6PC y PEPCK y un fragmento restante correspondiente al vector pGL3. El resultado se comprueba en geles de agarosa según lo descrito en el apartado 7.1.4.

## 6. INMUNOFLUORESCENCIAS

### 6.1. Procedimiento para la fijación, tinción y montaje de las células

Se sembraron  $1,25 \times 10^4$  células HepG2/pocillo sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro, en placas de 24 pocillos para cultivo celular. Antes de añadir las células, los cubreobjetos se pretrataron con Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich) durante 5 min, para mejorar la adherencia de las células. Para la realización de las inmunofluorescencias se siguió el siguiente protocolo:

- 1) Aspirar el medio de cultivo y lavar las células con PBS  $\text{Ca}^{2+}$  / $\text{Mg}^{2+}$ .

- 2) Fijar las células con paraformaldehído al 4% pH 7,4 durante 15 min a temperatura ambiente (RT, *Room Temperature*). Tres lavados con PBS.
- 3) Bloquear y permeabilizar con solución de bloqueo (PBS 1x/ Suero de cabra 5%/ Triton X-100 0,3% durante 60 min. Tres lavados con PBS.
- 4) Incubar con el anticuerpo primario preparado en buffer de dilución de anticuerpo (PBS 1x/ BSA (*Bovine Serum Albumine*) 1%/ Triton X-100 0,3%) toda la noche (ON, *over night*,) a 4º C (ver tabla 17, anticuerpos y sus diluciones). Tres lavados con PBS.
- 5) Incubar con el anticuerpo secundario (ver tabla 18), que lleva conjugado un fluoróforo, durante 1 hora RT. Añadir también Hoechst (33342) 5 µM, un compuesto autofluorescente a 405 nm que tiñe el DNA (Sigma-Aldrich). Tres lavados con PBS.
- 6) El montaje de los cubreobjetos se realiza sobre portaobjetos de 26 x 76 mm (Deltalab). Se empleó un medio acuoso de montaje, Fluoroshield™, con agentes contra la pérdida de fluorescencia (Sigma-Aldrich).

## 6.2. Obtención de imágenes mediante microscopía

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal (*Confocal Microscopy Leica TCS SP5*), objetivo APO CS 63x/1.32, usando como medio de transmisión aceite de inmersión (Immersol™ 518F, Zeiss). Las imágenes se procesaron con el software LAS AF *Lite* (Leica).



## 7. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El uso de todos los animales de experimentación fue aprobado por el comité ético de la universidad de Santiago de Compostela (procedimientos del Prof. Juan Bautista Zalvide Torrente; 1500AE/10/FUN01/PATO5A/JZT y 150010/14/003) de acuerdo con la normativa europea y española para el uso de animales de experimentación animal. En vista de las consideraciones éticas asociadas al uso de animales, los diseños experimentales se realizaron teniendo en cuenta el principio de las tres R (reemplazo, reducción y refinamiento). En base a estos principios, durante la realización de esta tesis, se aseguró que los procedimientos realizados fueran aquellos que: implicaran el uso mínimo de animales para alcanzar los objetivos; afectara lo mínimo a la capacidad para sentir dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero; y por tanto, tuvieran mayores probabilidades de producir resultados satisfactorios. Debido a la naturaleza intrínseca de esta tesis (objetivos y perspectiva terapéutica) resultó de gran relevancia validar los hallazgos *in vitro* con células HepG2 en un sistema *in vivo* que implicaba el uso de ratones. Sin embargo, se realizaron esfuerzos con el fin de reducir al máximo el número de roedores utilizados en los procedimientos. Con este objetivo, se estudiaron las diferentes variables a evaluar en cada experimento y se coordinó su diseño. La metodología empleada permitió la recolección de múltiples muestras de tejidos y la realización de distintos análisis sobre los mismos animales siempre que fuera posible.

En todos los procedimientos se usaron ratones generados a partir de células madre AM0826 de tipo 129/OLA conteniendo un vector (*trap cassette*) insertado en su genoma que interrumpe el gen de Mst3 (estas células se obtuvieron del Consorcio Internacional del Gene Trap (IGTC, *Gene Trap International Consortium*)). Las quimeras obtenidas tras la implantación de estas células que portaban la mutación en Mst3 se cruzaron con ratones C57/BL6J para obtener un fondo genético mixto de tipo 129sv/C57BL6J (*Background (B6;129)*). El genotipado y los detalles acerca de la generación de esta cepa se detallan en el apartado de puesta a punto del modelo animal del capítulo de resultados puesto que ha sido de gran dificultad y ha entrañado el detectar el lugar exacto de inserción de la mutación.

## 7.1. Genotipado de los ratones transgénicos

### 7.1.1. Selección de los oligonucleótidos para el genotipado

Los oligonucleótidos que se usaron para la determinación del lugar exacto de inserción se indican en la tabla 8, fueron diseñados por el software BioEdit y se encargó su síntesis a Sigma-Aldrich. Se muestran también las condiciones ajustadas para la amplificación del intrón 2 de Mst3 con combinaciones de estos oligonucleótidos mediante la técnica de Sybr Green en el termociclador (Mastercycler RealPlex<sup>4</sup>, Eppendorf) (tabla 9).

Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación por Sybr Green del intrón 2 de Mst3. Las posiciones en la placa se corresponden con las coordenadas de los pocillos de una placa de 96 pocillos.

Posición en placa	NOMBRE OLIGONUCLETÓTIDO	SECUENCIA (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)
A1	i2_500	GCTCCCTGTCTTTTCTCTGTCC	65,3
B1	i2_1000	GGGCCTGCTCCTTTTCTGACTT	68,3
C1	i2_1500	CTGTACTAGCTGAAGGGCCTGA	64,5
D1	i2_2000	GTCTAAGAATTACCTGCTTAGG	55,5
E1	i2_2500	GAAGTGTGGTAGATTATGTTT	51,8
F1	i2_3000	GATGAGGCCGTACCATTAATA	61,7
G1	i2_3500	TCAGTCAAATGGCTAAAATTAC	57,4
H1	i2_4000	TGGATGTACCATCCGAGAGAC	67,2
A2	i2_4500	TTTAATGGTGGTTTATCACAGC	60,3
B2	i2_5000	CCAGACCAACTGTGGACCCTGG	72,1
C2	i2_5500	TTTGTTTGTGTTTGTGTTTTGT	57,8
D2	i2_6000	ACAGATTCCTATAAGCACCCAT	60,3
E2	i2_6500	TCTTGTTAGTCCCTTTAGCAGG	61,2
F2	i2_7000	GAGACTCCGGCAGACTCTGAAT	65,9
G2	i2_7500	CTCATTTTTACTCTTGTCATT	54,4
H2	i2_8000	CCCTCAGCTATGGTAAGAGGCG	67,8
A3	i2_8500	AGTTGATTCTTCCGGAAGTAA	62,6
B3	i2_9000	GCACAAGGTTGATGATAGATCA	61,5
C3	i2_9500	CTGGAAGGAAGATCTTTGGTTC	62,8
D3	i2_10000	TTGGCAGAGGTGTGATTGCCAT	70,8
E3	i2_10500	TTTAACCCTTGCAGATTATCTG	59,7
F3	i2_11000	GTTATGAATGCCAGGTTATTAA	57,2

G3	i2_11500	CTCTAGGACTCCCAGGCCACAT	67,6
H3	i2_12000	TGAAAGCATACTTTATTTTCCA	57,9
A4	i2_12500	GGTGAGGGACATCAGGGCGTGA	74,7
B4	i2_13000	GCAGGTGAGGAACTGGACTAG	64
C4	i2_13500	AGACTCCCTGCCTCCGAATGCC	73,5
D4	i2_14000	TTCTCCCGGCTCATTGTGGCT	74,6
E4	i2_14500	CTTGGGCCCACGCAAACGCTTT	76,1
F4	i2_15000	CAGTGTGTGGCCTCTCTGGTT	67,6
G4	i2_15500	CTCTTAGATCATTGCTTGAGA	57,4
H4	i2_16000	CGGATCCCACACATGCACCTAT	69,9
A5	i2_16500	AGAATGATGTAAATCATAGATA	49,7
B5	i2_17000	TGTCTGCAGATGATAAAGGCAA	64,5
C5	i2_17500	GCGTGTACCACCACTGCCTGGC	74,9
D5	i2_18000	TATCCAGTCTCTGTATGCTTAG	55,3
E5	i2_18500	TGTCTCATTTTAGCTGAAGTTT	57,3
F5	i2_19000	AAAGACAGGGCTGCTGTGGA	69
G5	i2_19500	GGTAAGTTGGATTTCTGTTTTA	56,5
H5	i2_20000	GGATACCTTGGAGTTGACCTT	64,1
A6	i2_20500	TTTGAAAGCACAAGAGGATGCT	64,9
B6	i2_21000	CTTAGTTCTAGGGAGGTAAATG	55,4
C6	i2_21500	CCCCCCCCAGGCTCTGGTGTTT	76,5
D6	i2_22000	AAATCATTTCTGTTGCTTTTCA	62,2
E6	i2_22500	TTTATTTCTTCACAAAATCCAT	56,8
F6	i2_23000	CAGTGCCTGAACTCTCTTCTC	62,1
G6	i2_23500	GGCCATCTCCTGCCCTCCCT	77,7
H6	i2_24000	ACCCACAGAGCGGCAGCGCAA	78,5
A7	i2_24500	TACAGCCATGAAGTTGTTGTGT	62
B7	i2_25000	TGTCCCACCATGGACCCTGTCA	74,2
C7	i2_25500	ATTACAGAGGTGCACTACCACA	61,1
D7	i2_26000	GTGTTGTGAATATGTGTGTGT	57,3
E7	i2_26500	CCAGCAGAGGAGGGTCACAGTG	70,6
F7	i2_27000	AGGTCAGTCGTTAGGAAATAGT	57,5
G7	i2_27500	AAAACAAGTTAGTCCCAGTGCC	63,1
H8	i2_28000	GCACCATGTTTGAGCAGATCCA	69,4
A8	i2_28500	CCCAACCCAGCGAGTACAAAA	70,7
B8	i2_29000	TGGTGGGTGGGAAGTGTCTGT	69,9

C8	pGT10_8f	AATTCATGGGAAGAGGAACC	61,7
D8	pGT10_283f	GCCCTGCTCCCTCATCCTCAGC	74,4
E8	pGT10_603f	ATGGTCGGGCCTTCTCCAGCCT	74,7
F8	pGT10_882f	CTGCCAACTATGTAGGAGGAAG	61,6
G8	pGT10_1188f	CCTCAGCCTTGGCTCCTCCTGG	74,2
H9	pGT10_1490f	GTATCTGCAACCTCAAGCTAG	58,2
A9	pGT10_396r	CATCCGGGACAGTGCAGATCC	71,2
B9	pGT10_904r	CTTCCTCTACATAGTTGGCAG	61,6
C9	pGT10_1302r	GGAACCTTCGGAATAGGAACCTTC	61,7
Control +	Oligo_80 reverso	ATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGG	59

Tabla 9. Condiciones de la PCR cuantitativa tipo Sybr Green.

Paso	T <sup>a</sup> (°C)	Tiempo	Nº ciclos
Pretatamiento UDG	50	2 min	1
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 seg	40
Anillamiento	55	30 seg	
Extensión	72	1 min	

### 7.1.2. Extracción de DNA a partir de un fragmento de cola

Para genotipar a estos ratones se tomó una pequeña muestra de la punta de la cola, lo que se hacía a los 21 días de edad, una semana antes del destete. A continuación, o se almacenaba la muestra a -20°C o se procedía con la extracción de ADN. Para la extracción de ADN se añadían 450 µL de tampón de cola (*tail buffer*) y 15 µL de Proteinasa K 20 mg/mL (Promega) para luego incubar toda la noche a 55°C. La composición del **tampón de cola** es la siguiente: SDS 1%/ NaCl 0,1 M/ EDTA 0,1 M/ Tris 0,05 M pH 8). Una vez digerido el ADN se procedió según el protocolo:

- 1) Añadir 200 µL de acetato potásico 5 M sobre el tampón de cola con la cola digerida. Agitar bien y dejar reposar 1-2 min.

- 2) Centrifugar a 12.000 rpm durante 2-3 min. En este punto debe observarse un precipitado en el fondo del tubo.
- 3) Eliminar el sobrenadante y transferir a un tubo nuevo.
- 4) Añadir aproximadamente 700-800 µL de isopropanol al sobrenadante. Agitar bien y dejar reposar de 1-2 min.
- 5) Centrifugar a 12.000 rpm durante 2 min. En este momento se debe visualizar un pequeño pellet.
- 6) Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no perder el precipitado.
- 7) Añadir 600 µL de etanol 70% e invertir el tubo varias veces para lavar el pellet.
- 8) Centrifugar a 12.000 rpm durante 2 min.
- 9) Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente (15-20 min dejando los tubos abiertos).
- 10) Resuspender en aproximadamente 50 µL de tampón TE (Tris-EDTA) y guardar a 4º C hasta el momento de la PCR.

**7.1.3. Amplificación mediante PCR convencional** Una vez determinado el lugar de inserción del vector se procedió a la síntesis de unos oligonucleótidos válidos (tabla 10) para el genotipado a partir de DNA genómico procedente de la cola del ratón mediante una PCR convencional con las condiciones que se indican en la tabla 11. La síntesis de estos oligonucleótidos se encargó a Thermo Scientific.

Tabla 10. Oligonucleótidos para el genotipado de ratones *Wild Type* (WT) o *Gene Trap* (GT).

Denominación	Secuencia (5'→3')	Dirección	Tm (°C)
Oligo 17941f	AAAGCGGTGGGGAAATTAGAAAA	Directo	57,1
Oligo 18245r	CTCTGTATAGCCCTGGCTGCATACAA	Reverso	59,6
Oligo GT	GGCACCACGACCTGGCTTA	Reverso	59,4

Tabla 11. Condiciones de la PCR convencional para el genotipado de ratones WT o GT.

Paso	Tª (°C)	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	33
Alineamiento	56	30 seg	
Extensión	72	45 seg	
Elongación final	72	10 min	1

Las cantidades usadas de cada reactivo para una reacción de volumen final 20 µL fueron:

- ✓ **H<sub>2</sub>O miliQ** → 11,64 µL
- ✓ **Tampón Taq Polimerasa 10x** (Thermo Fisher Scientific) → 2 µL
- ✓ Mezcla de **dNTPs** 4 mM (dTTp, dCTp, dGTp, dATp) (Invitrogen) → 1 µL
- ✓ **Oligo 17941f** 5 µM → 1,6 µL
- ✓ **Oligo 18245r** 5 µM → 1 µL
- ✓ **Oligo GT** 5 µM → 0,6 µL
- ✓ **Taq Polimerasa** (*DreamTaq*, Thermo Fisher Scientific) → 0,16 µL

Las incubaciones se hicieron en el termociclador T-personal Thermal Cycler (Biometra)

#### 7.1.4. Electroforesis en gel de agarosa

La separación de los fragmentos de DNA correspondientes al alelo WT o alelo GT se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa según los procedimientos descritos por (Sambrook, Fritsch et al. 1989). El gel se preparó a una concentración de agarosa del 1,5% en tampón de electroforesis TAE (Tris 40 mM pH 7,6/ Ácido acético 20 mM/ EDTA 1 mM) y se le aplicó un voltaje de 90 V y una intensidad máxima de 400 mA durante 40 minutos sumergido en tampón de electroforesis. El DNA se visualizó mediante la incorporación de Red Safe (iNtRON Biotechnology) al gel, usando un transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc 1000 (BIO-RAD). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen).

#### 7.2. Estabulación

Los animales se estabularon en condiciones controladas de luz (12 horas luz/ 12 horas oscuridad) y temperatura (22°C). Los animales se mantuvieron con acceso libre a comida y agua, excepto en los procedimientos experimentales que requirieran un ayuno nocturno

(como se especificará más adelante). Para su mantenimiento general y cría se alimentaron con un pienso sólido comercial que constituía una dieta SD (*Standard Diet*, dieta estándar) (**Harlan Laboratories, #2019 Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet**). En el caso del modelo de obesidad inducida por dieta, a las 8 semanas de edad se les sustituía la dieta SD por una dieta alta en grasa (HFD, *High Fat Diet*,) (**Research Diets, #12451 Rodent Diet with 45% kcal% fat**) durante 21 semanas. En la siguiente tabla se muestra una comparativa de la composición de estos dos tipos de dieta:

Tabla 12. Composición en %kcal de dieta SD y dieta HFD.

Composición	SD %kcal	HFD %kcal
Proteína	23	20
Carbohidrato	55	35
Grasa	22	45
Total	100	100
kcal/g	3,3	4,73

### 7.3. Diseño experimental

El esquema general y temporal para el estudio metabólico comparativo de ratones WT y KD de Mst3 se detalla en la figura 22. Desde su destete a las 4 semanas, los animales se mantuvieron en dieta estándar hasta alcanzar las 8 semanas. A esta edad se realizaron distintas determinaciones metabólicas durante 3 semanas donde permanecían con dieta estándar. Terminadas las determinaciones, cuando tenían 11 semanas de edad se les cambió a dieta HFD y se les mantuvo durante 21 semanas con esta dieta anotando semanalmente el peso hasta que alcanzaron las 32 semanas de edad. En este punto cuando alcanzaron un estado obeso y de resistencia a insulina se realizaron nuevas determinaciones metabólicas durante 3 semanas mientras se les mantenía en la dieta HFD. Al finalizar los procedimientos pertinentes, con unas 35 semanas de edad se les sacrificó 20' después de inyectarles con piruvato y se procedió a la recogida de tejidos y muestras como se redacta en el apartado 7.7.





FIGURA 22. Esquema del diseño experimental para el análisis metabólico de ratones WT y KD desde su inicio en dieta convencional hasta su sacrificio una vez alcanzaron un estado de obesidad con dieta HFD.

#### 7.4. Fenotipado metabólico

El fenotipado metabólico se llevó a cabo mediante un sistema de calorimetría indirecto formado por jaulas individuales que presentan ventilación y sensores que registran la actividad locomotora (LA, *locomotor Activity*), el gasto energético (EE, *Energy expenditure*), cociente respiratorio (RQ, *Respiratory Quotient*). También presenta sensores específicos para el control de la ingesta de comida (FI, *Food Intake*). (LabMaster TSE Systems, Germany). Los animales permanecieron las 48 horas previas al experimento en unas cajas especiales para que se adaptaran al tamaño de la jaula y al sistema de comida y bebida que presenta el sistema de fenotipado, pasado este periodo los animales se estabularon en la cajas metabólicas y permanecieron dentro durante un período de 48 horas durante el cual se llevó a cabo la toma de medidas para los diferentes parámetros cada 30 minutos. Se pueden medir los parámetros de forma continua y simultáneamente en un máximo de 12 animales. Este tipo de sistemas permite reflejar el estado nutricional del organismo en estudio bajo diferentes condiciones genéticas, farmacológicas o usando distintos tipos de dieta o permite establecer patrones de partición nutricional.

#### 7.4.1. Tasa de respiración metabólica (RQ, *Respiratory Quotient*)

La RQ se obtiene del cociente de  $v\text{CO}_2$  (volumen de  $\text{CO}_2$  expulsado) entre el  $v\text{O}_2$  (volumen de  $\text{O}_2$  consumido) ( $v\text{CO}_2/v\text{O}_2$ ), que es diferente entre los periodos de luz y oscuridad. Los valores de la ratio determinan cuál es el macronutriente de preferencia para realizar la oxidación (tabla 13).

Tabla 13. Energía liberada cuando los macronutrientes se metabolizan con 1 L de  $\text{O}_2$ . Tabla adaptada de (Arch, Hislop et al. 2006).

Macronutriente	RQ	Energía liberada (kcal)
Carbohidratos	1,0	5,047
Lípidos	0,718	4,735
Proteína	0,802	4,463

#### 7.4.2. Determinación del gasto energético (EE, *Energy Expenditure*).

El valor de EE se establece por las kilocalorías consumidas en las 48 horas de medición utilizando el consumo de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) y la producción de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). En los estudios metabólicos es importante relativizar los parámetros de la variación del gasto energético con la variación del peso o composición corporal. Estos parámetros pueden variar o no ante determinados tratamientos, manipulaciones génicas o estados metabólicos. Para poder aislar el efecto de la variación metabólica por las manipulaciones anteriormente mencionadas es necesario normalizar el gasto energético. El método más extendido es la corrección sobre el peso corporal total del individuo de estudio. En este trabajo se expresa el EE como Kcal/h/kg.

#### 7.5. Determinación de la composición corporal

Para la realizar las medidas de composición corporal se ha usado la técnica de resonancia magnética nuclear (Whole Body Composition Analyzer; EchoMRI). Las medidas se realizaban antes de proceder al fenotipado metabólico de los animales y se determinaron tanto su % de masa grasa como su % de masa grasa en función del peso corporal.

## 7.6. Test de tolerancia a glucosa, insulina y piruvato

Los test de tolerancia a glucosa (GTT, *Glucose Tolerance Test*), insulina (ITT, *Insulin Tolerance Test*) y piruvato (PTT, *Pyruvate tolerance test*) permiten conocer la capacidad que tiene el metabolismo de un individuo para tolerar la glucosa, el grado de resistencia a insulina y la capacidad para formar glucosa mediante gluconeogénesis respectivamente. Para esto la noche previa al test se deja a los animales en ayuno, a primera hora de la mañana se realiza una medida de los valores de glucosa basales, tomando una muestra de sangre a través de una incisión en la cola. La gota obtenida se deposita en una tira reactiva (*GLUCOCARD™ G Sensor*) conectada a un glucómetro (*GLUCOCARD G+ meter*, A. MERANINI diagnostics). A continuación, se pesan los animales y se les inyecta con glucosa, insulina o piruvato intraperitonealmente (IP) con una dosis dependiente de su peso y del test a realizar (2g/kg peso corporal de D-glucosa, 0,75U/kg peso corporal de insulina y 1,25g/kg peso corporal de piruvato respectivamente). Una vez inyectados, se toman medidas de glucosa sanguínea a través de la cola a los 15, 30, 60, 90 y 120 min. después de la inyección. Con los datos obtenidos se construye una curva a partir de la cual se calcula el Área Bajo la Curva (AUC, *Area Under Curve*) de cada uno de los grupos experimentales por separado.

## 7.7. Sacrificio y recogida de tejidos y muestras

Al final de los procedimientos, cuando se requería la colección de muestras/tejidos, los animales fueron sacrificados por decapitación 20 minutos después de aplicarles una inyección intraperitoneal con piruvato a una dosis de 1,25g/kg peso corporal. Las muestras de tejido obtenidas por disección, se exponían a rápida congelación en anhídrido carbónico sólido (nieve carbónica) y posteriormente almacenadas a -80°C (análisis de mRNA, proteína, valores séricos), para análisis histológicos se les introducía en formalina para su posterior inclusión en parafina.

## 7.8. Determinaciones en muestras de ratones

### 7.8.1. Determinación de insulina en suero

Para la determinación de insulina en suero se mantuvieron los ratones en ayunas durante un periodo de 3 horas y se les extrajo sangre a través de la vena de la cola.

Esta sangre se dejó coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos y se obtuvo el suero por centrifugación a 6000 rpm. Posteriormente se analizó la cantidad de insulina presente mediante un kit de ELISA comercial. (ELISA Kit #EZRMI-13K, MILLIPORE) La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro. (Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader, BERTHOLD).

#### **7.8.2. Determinación de triglicéridos en hígado**

Para la extracción de triglicéridos se pesan 100 mg de hígado y se llevan a un tubo de polipropileno de 2 mL con una bola de acero y 1 mL de cloroformo/metanol (2:1 v/v). El tejido se homogeniza gracias a la acción mecánica de la bola al introducir los tubos en una máquina de homogenización mecánica (Tissue Lyser, Quiagen) durante 5 minutos a 30 rpm. Se procedió siguiendo los protocolos descritos por (Frayn and Maycock 1980, Storlien, Jenkins et al. 1991). La concentración de triglicéridos (TG) presente en una muestra se determina tras la evaporación de una parte de la fase orgánica obtenida. Al precipitado resultante se le añade el reactivo de TAG incluido en un kit específico (Tryglycerides kit, Spinreact) y se procede siguiendo las instrucciones indicadas por dicho fabricante. La cantidad de triglicéridos presentes en la muestra se determina por colorimetría en un espectrofotómetro (Multiskan™ GO Microplate, Thermo Fisher) mediante el uso de una recta patrón y corrigiendo los valores obtenidos por el peso del tejido.

#### **7.8.3. Determinación de la cantidad de glucógeno en hígado**

Para la determinación de glucógeno se usó un kit (Glycogen Assay Kit, Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. El protocolo para la preparación de la muestra se realizó teniendo en cuenta que el glucógeno se metaboliza muy rápido y que la congelación ha de ser rápida tras la extracción del hígado y que tras la descongelación debe mantenerse en frío en todo momento. Se procedió de la siguiente forma:

- 1) Cortar 10 mg de tejido y llevar a un tubo de polipropileno de 2 mL con una bola de acero.
- 2) Añadir 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O miliQ.

- 3) Someter a homogenización mecánica en un (Tissue Lyser, Quiagen) durante 5 minutos a 30 rpm.
- 4) Calentar las muestras a 95°C durante 5 minutos para la inactivación de enzimas degradantes.
- 5) Centrifugar a 13.000 rpm.
- 6) Recoger sobrenadante y proceder inmediatamente con el kit.

Los niveles se midieron por colorimetría en un espectrofotómetro (Multiskan™ GO Microplate, Thermo Fisher) mediante el uso de una recta patrón con cantidades conocidas de glucógeno y corrigiendo los valores obtenidos por el peso exacto del tejido.

#### **7.8.4. Tinción hematoxilina/eosina de cortes histológicos de hígado**

Para la tinción, el tejido fijado con formalina se incluyó en parafina para luego ser seccionado en un micrótomos. Los cortes de parafina se prepararon con xilol para eliminar los excesos de la misma. Después se pasaron los cortes por un proceso de rehidratación, consistente en alcoholes de concentración decreciente (100%, 95% y 70%). Tras un lavado con H<sub>2</sub>O destilada se sumergieron en hematoxilina (Bio Óptica) durante 10 minutos, se lavaron e inmediatamente se pasaron por un alcohol ácido. Tras el lavado se sumergieron 30 segundos en eosina (Bio Óptica). Para deshidratar la muestra se pasaron los cortes por los mismos alcoholes en graduación creciente, y antes de montar se dejaron sumergidos 10 minutos en xilol. Los portaobjetos se montaron en medio de montaje acuoso y se realizaron las imágenes en un microscopio óptico (Zeiss AxioPlan 2 Microscope System).

## **8. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL**

El proceso para la determinación de los niveles de expresión génica a través de la medición de los niveles de mRNA presentes en una muestra es común tanto para las obtenidas de tejido de ratón como para las procedentes de cultivo celular. Las diferencias

en el proceso de obtención, son debidas a la naturaleza de las muestras y se detallan en los subapartados 8.1 y 8.2.

### 8.1. Obtención de lisados de hígado para extracción de RNA

Para la extracción total del contenido de RNA de hígado se cortan 50 mg del tejido almacenado a -80°C manteniéndolo congelado en todo momento, se pone en un tubo de polipropileno de 2 mL con una bola de acero dentro y se añaden 400 µL de TRIzol® Reagent (Invitrogen), compuesto que contiene tiocinato de guanidinio para la degradación proteica. El tejido se homogeniza gracias a la acción mecánica de la bola al introducir los tubos en una máquina de homogenización mecánica (Tissue Lyser, Quiagen) durante 5 minutos a 30 rpm.

### 8.2. Obtención de extractos celulares para extracción de RNA

Para la extracción de RNA a partir de cultivo celular de células HepG2, en primer lugar se eliminaron los restos de medio de cultivo mediante un lavado con PBS frío, se aspiró el exceso de PBS y manteniendo las placas en hielo se añadió el reactivo Trizol a razón de 400 µL por placa de 9 cm<sup>2</sup>. Los subsiguientes pasos son válidos para ambas:

### 8.3. Aislamiento del RNA

Para el aislamiento del RNA se siguen las instrucciones indicadas para el fabricante del reactivo trizol que se basa en la técnica de fenol-cloroformo e incluye la precipitación con isopropanol. El pellet obtenido se lava con etanol al 70% y tras dejarlo secar se resuspende en un volumen de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas por tratamiento dietilpirocarbonato (DEPC). Para evitar contaminación con DNA genómico, se realizó una digestión con DNasa libre de RNasa (Roche) del RNA total extraído. La siguiente tabla indica las cantidades para una reacción de volumen final 50 µg.

- ✓ H<sub>2</sub>O miliQ → 9,5 µL
- ✓ Tampón DNasa 10x (Roche Diagnostics) → 5 µL
- ✓ RNase Out (Invitrogen) → 0,5 µL
- ✓ DNasa RNasa free (Roche Diagnostics) → 1 µL
- ✓ Muestra RNA total → 34 µL

La reacción se incubó a 37°C durante 20 minutos.



Puesto que la DNasa no se inactiva por calor, para tener las muestras de RNA lo más puras posible es adecuado eliminar la presencia de DNasa de las muestras lo que se consigue repitiendo el proceso de extracción con la adicción de 50  $\mu\text{L}$  de trizol. Finalmente, el pellet de RNA puro se resuspende en agua DEPC y se cuantifica en NanoDrop 2000.

#### 8.4. Retrotranscripción

La retrotranscripción consiste en la amplificación del RNA extraído en forma de DNA complementario (cDNA) y se hizo partiendo de 300 ng de RNA. Los reactivos se añadieron a dos tiempos (RT-I y RT-II) y las cantidades para una reacción de volumen final 20  $\mu\text{L}$  se muestran a continuación:

##### Mezcla RT-I

- ✓ **H<sub>2</sub>O miliQ**  $\rightarrow$  2,3  $\mu\text{L}$
- ✓ **Random primers** 300  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Invitrogen)  $\rightarrow$  0,7  $\mu\text{L}$
- ✓ **Mezcla de dNTPs** 2,5 mM (dTTP, dCTP, dGTP, dATP) (Invitrogen)  $\rightarrow$  4  $\mu\text{L}$
- ✓ **Muestra RNA** a 60 ng/ $\mu\text{L}$   $\rightarrow$  5  $\mu\text{L}$

##### Mezcla RT-II

- ✓ **First Strand Buffer 5x** (Invitrogen)  $\rightarrow$  4  $\mu\text{L}$
- ✓ **DTT 0,1 M** (Invitrogen)  $\rightarrow$  2  $\mu\text{L}$
- ✓ **RNase Out** (Invitrogen)  $\rightarrow$  1  $\mu\text{L}$
- ✓ **M-MLV RT**  $\rightarrow$  1  $\mu\text{L}$

La mezcla RT-I se incuba durante 5 minutos a 65°C, seguidamente se le añade la mezcla RT-II y se continúa la incubación en el termociclador T-personal con las siguientes condiciones:

1. 25°C  $\rightarrow$  10 min
2. 37°C  $\rightarrow$  50 min
3. 70°C  $\rightarrow$  15 min

#### 8.5. PCR tiempo real (qPCR)

Una vez obtenido el cDNA, se determinaron los niveles de mRNA de los genes de interés mediante PCR a tiempo real, en el equipo Mastercycler RealPlex<sup>4</sup>. Se emplearon sondas tipo Taqman, específicas para cada uno de los genes, que se incluyen en la tabla 14. El



equipo detecta la fluorescencia producida por la molécula fluorescente (TAMRA) tras cada ciclo de amplificación. Para determinar la concentración de cDNA en cada muestra se analiza el valor CT (número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente supere el umbral definido por los niveles de fondo o *background*). El valor del CT es inversamente proporcional a la cantidad de cDNA y se relativiza a la cantidad de cDNA de cada gen contenido en la muestra con un gen de referencia o HK (HK, *Housekeeping*).

Tabla 14. Listado de las distintas sondas Taqman empleadas para la PCR a tiempo real.

GEN	ASSAY ID	PROVEEDOR
<i>G6PC H. sapiens</i>	105120	Roche Diagnostics
<i>G6pc M. musculus</i>	300059	Roche Diagnostics
<i>G6PC H. sapiens</i>	Hs02560787_s1	Applied BiosystemsTM
<i>G6pc M. musculus</i>	Mm00839363_m1	Applied BiosystemsTM
<i>PCK1 H. sapiens</i>	113980	Roche Diagnostics
<i>Pck1 M. musculus</i>	300094	Roche Diagnostics
<i>PCK1 H. sapiens</i>	Hs01572978_g1	Applied BiosystemsTM
<i>Pck1 M. musculus</i>	Mm01247058_m1	Applied BiosystemsTM
<i>FASN H. sapiens</i>	137088	Roche Diagnostics
<i>Fasn M. musculus</i>	310668	Roche Diagnostics
<i>CPT1A H. sapiens</i>	126594	Roche Diagnostics
<i>Cpt1a M. musculus</i>	3134457	Roche Diagnostics
<i>ACACA H. sapiens</i>	116393	Roche Diagnostics
<i>Acaca M. musculus</i>	310268	Roche Diagnostics
<i>STK24 H. sapiens</i>	Hs00269168_m1	Applied BiosystemsTM
<i>Stk24 Mus musculus</i>	Mm00520930_m1	Applied BiosystemsTM
<i>RPLP0 H. sapiens HK</i>	101144	Roche Diagnostics
<i>RPLP0 H. sapiens HK</i>	Hs99999902_m1	Applied BiosystemsTM
<i>Rplp0 M. musculus HK</i>	Mm00725448_s1	Applied BiosystemsTM
<i>ACTB H. sapiens HK</i>	101125	Roche Diagnostics

<i>ACTB H. sapiens HK</i>	Hs01060665_g1	Applied Biosystems™
<i>Actb M. musculus HK</i>	Mm00607939_s1	Applied Biosystems™
<i>GAPDH H. sapiens HK</i>	Hs02758991_g1	Applied Biosystems™
<i>Gapdh M. musculus HK</i>	Mm99999915_g1	Applied Biosystems™
<i>St3gal5 M. musculus</i>	Mm00488237_m1	Applied Biosystems™
<i>Aldh3a2 M. musculus</i>	Mm00839320_m1	Applied Biosystems™
<i>Slc1a2 M. musculus</i>	Mm00441457_m1	Applied Biosystems™
<i>PPAR Gamma H. sapiens</i>	Hs00234592_m1	Applied Biosystems™
<i>18S H.sapiens</i>	Hs99999901_s1	Applied Biosystems™

Dependiendo de la casa comercial de las sondas empleadas, se utilizó TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), o bien, FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Diagnostics). La mezcla de la reacción de la qPCR se realiza en un volumen final de 20 µL y contiene:

- ✓ **Muestra cDNA** → 1,5 µL, diluirla con H<sub>2</sub>O hasta 4 µL
- ✓ **Master Mix 2x** → 10 µL
- ✓ **Sonda Taqman 20X** → 1 µL
- ✓ **H<sub>2</sub>O** → 5 µL

Todas las muestras se cargaron por duplicado y para cada muestra se incluyeron 2 genes *housekeeping* por cada experimento analizado. El protocolo usado para la amplificación consistió en:

Tabla 15. Condiciones de la qPCR

Paso	Tª (°C)	Tiempo	Nº ciclos
1	50	2 min	1
2	95	10 min	1
3	95	15 seg	40
4	60	1 min	

Los resultados se analizaron con el software 7500 SDS versión 2.0.1 (Applied Biosystems). Los valores CT de cada gen para cada muestra se corrigieron por su valor correspondiente de *housekeeping* y además todas las ellas se normalizaron a la muestra control sin tratamiento o vehículo o al ratón WT dándoles el valor 1.

## 9. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS

### 9.1. Extracción de proteína a partir de lisados de hígado

De las muestras de tejido conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se pesaron 50 mg para su procesado. Durante todo el proceso las muestras se mantuvieron en hielo y se transfirió el fragmento a un tubo de polipropileno de 2 mL con una bola de acero dentro. Se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis y se sometieron a homogenización en el *Tissue Lyser* durante 5 minutos a 30 rpm, como se describió para la extracción de RNA. El tampón de lisis para muestras de tejido se prepara en  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ con la siguiente composición: Tris-HCl 50 mM pH 7,5/ EGTA 1 mM/ EDTA 1 mM/ Tritón X-100 1% v/v/ Ortovanadato Sódico 1 mM/ Fluoruro Sódico 50 mM/ Pirofosfato Sódico 5 mM/ Sacarosa 0,27 M/ Fluoruro de fenilsulfonilo 1 mM.

Tras la homogenización las muestras se centrifugan a 13.200 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. A continuación, el sobrenadante (extracto proteico) se transfiere a un tubo nuevo, descartando el precipitado (membranas y material extracelular) y la posible capa superior de grasa. En el caso de encontrarse mucha grasa se deben realizar varias centrifugaciones sobre el extracto inicial para descartarla.

### 9.2. Extracción de proteína en cultivo celular

La extracción de proteínas a partir de cultivo celular se realizó según el siguiente protocolo:

- 1) Retirar el medio de cultivo de las células y lavar con PBS frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

- 2) Situar las placas de cultivo en hielo y añadir el tampón de lisis. Despegar las células mediante el uso de un scraper o rascador (BD Falcon) y recoger en un tubo eppendorf.
- 3) Mantener en hielo 10 min, vorteoando cada 5 min.
- 4) Centrifugar (10 min, 13.000 rpm, 4° C) y llevar el sobrenadante a un nuevo tubo. Almacenar los extractos a -80° C o llevar a análisis.

La composición del tampón para la extracción proteica de cultivo se obtuvo por una modificación de la receta descrita por (Fuller, McGuffin et al. 2012) y contenía: Tris/HCl 20 mM pH 7.5/ KCl 300 mM/ MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaF 5 mM/ EDTA 1 mM/ Na<sub>3</sub> VO<sub>4</sub> 0,2 mM/ 10% glicerol/ 1% Triton X-100/ 0,05% β- mercaptoetanol.

Tanto al tampón de lisis de tejidos de ratón como para el de cultivo de células, se les añadieron inhibidores de proteasas para preservar la integridad de las proteínas: DTT 1 mM/ Leupeptina 2 μM/ PMSF 400 μM/ Aprotinina (Sigma-Aldrich) 2,3 μg/mL. En el caso de que la propia composición del tampón no incluya fluoruro sódico (NaF) se le adiciona a una concentración de 1 mM como inhibidor de fosfatasas y un cocktail comercial inhibidor de fosfatasas (PhosSTOP™, Roche) a una concentración final 1x. En los subsiguientes pasos, el procesamiento de la proteína para su análisis por *Western Blot (WB)* es común para ambos tipos de muestra; tejido y cultivo celular.

## 10. CUANTIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS, MÉTODO DE BRADFORD

La cuantificación de los extractos de proteínas se hizo siguiendo el método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se empleó el reactivo Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD) y se midió la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro UV/Vis Spectronic BioMate 3 (Thermo Electron Corporation). La recta de calibrado se realizó a partir de concentraciones conocidas de inmunoglobulina G (Sigma-Aldrich). En el caso de

muestras de hígado fue necesario diluir los extractos hasta obtener valores dentro de la recta patrón.

## 11. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

### 11.1. Preparación de las muestras para electroforesis en SDS-PAGE

Tras la cuantificación se prepararon las muestras con el tampón de carga (tampón de Laemmli). El tampón Laemmli se preparó concentrado 5x con la siguiente composición: Tris-HCl 400 mM pH 6,8/ SDS 10% p/v/  $\beta$ -mercaptoetanol 5%/ Glicerol 50%/ Azul de Bromofenol 0,4%). Se cargaron cantidades iguales de proteína (por norma general para todos los geles empleados en este trabajo se trataba de 50  $\mu$ g) en un volumen final de 25  $\mu$ L con el tampón Laemmli, debe quedar una concentración 1x. Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos para su completa desnaturalización. En este punto, se almacenaron a -20°C o se cargaron directamente en el gel.

### 11.2. Electroforesis en SDS-PAGE

Los extractos proteicos se resolvieron mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), siguiendo el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Estos geles constan de dos fracciones: un **gel separador** en la parte inferior de la carcasa que permite la separación de las proteínas en función de su peso molecular y un **gel concentrador** que permite igualar la entrada de las proteínas en el gel separador y se localiza en la parte superior. En el gel concentrador es donde se sitúan los peines que conforman los pocillos donde se carga la muestra. La composición de gel concentrador y de los geles empleados en % creciente de acrilamida se muestra en la tabla 16. El porcentaje de acrilamida-bisacrilamida es variable dependiendo del tamaño de las proteínas que queremos estudiar y en relación inversa. Como marcador de peso molecular se utilizó BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen).

Tabla 16. Composición de los geles SDS-PAGE concentrador y separador.

Componente	Gel separador %				Gel concentrador %
	6%	8%	10%	12%	5%
H <sub>2</sub> O miliQ	5,3 mL	4,6 mL	4,0 mL	3,3 mL	3,4 mL
30% Acrilamida/Bis	2,0 mL	2,7 mL	3,3 mL	4,0 mL	0,83 mL
Tris-HCl 1M pH 6,8	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	-
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	-	-	-	-	0,63 mL
10% SDS	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,05 mL
10% APS	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,05 mL
TEMED	0,008 mL	0,006 mL	0,004 mL	0,004 mL	0,005 mL
Volumen final/1 gel	10 mL				5 mL

Los geles se montan en una carcasa de electroforesis (*miniVE Vertical Electrophoresis System, Amersham, GE Healthcare Life Sciences*) y se introducen junto con el tampón de electroforesis (RB, *Running Buffer*) (Tris-HCl 200 mM/ Glicina 20 mM, SDS 1% p/v) en una cubeta que permite la transmisión del voltaje. Se cargan las muestras y el marcador de proteínas de peso molecular conocido y se conecta a la fuente de alimentación a un voltaje de 150 V, 400 mA.

### 11.3. Transferencia semi-seca

Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron a una membrana de PVDF (PVDF, Polyvinylidene fluoride, Immobilon-P Transfer Membrane para quimioluminiscencia o Immobilon-FL para fluorescencia) de 0,45 µm (Millipore), mediante la utilización de un equipo de transferencia semi-seca Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BIO-RAD). El proceso de transferencia de gel a la membrana es dependiente de voltaje y es necesario colocar papel absorbente empapado de tampón de transferencia (TB, *transfer buffer*): Tris-HCl 40 mM/ Glicina 40 mM/ SDS 0,36% p/v/ Metanol 20% v/v. El orden de las capas desde la base del aparato de transferencia es:

1. papel absorbente empapado en TB
2. membrana activada con metanol
3. gel de acrilamida con las proteínas separadas
4. papel absorbente empapado en TB

En este proceso, las proteínas pasan del gel de acrilamida a la membrana de PVDF donde quedan inmovilizadas. El proceso se realiza a un voltaje constante de 25V, 400 mA durante 1 hora. Es necesario activar la membrana previamente a la transferencia sumergiéndola durante 5 minutos en metanol y lavándola posteriormente con H<sub>2</sub>O destilada otros 5 minutos. También es conveniente equilibrarla 5 minutos en el propio tampón de transferencia.

#### **11.4. Inmunodetección**

Para la inmunodetección se emplearon sistemas de quimioluminiscencia y de fluorescencia.

##### **11.4.1. Quimioluminiscencia:**

La membrana de PVDF se incubaba en agitación durante 1h RT en solución de bloqueo (PBS con 0,1% Tween-20 y 5% w/v leche en polvo). A continuación, se hibrida con el anticuerpo primario, según las diluciones especificadas (tabla 17), ON a 4º C y en agitación. Al día siguiente, se hibrida con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a la enzima HRP (HRP, *Horse Radish Peroxidase*) (tabla 18), durante 1h RT y en agitación. Tanto el anticuerpo primario como el secundario se incuban con una solución de dilución de anticuerpo (PBS con 0,1% Tween-20 y 5% p/v BSA (Sigma-Aldrich)). La inmunodetección se realizó con el kit de quimioluminiscencia Pierce® ECL Western Blot Substrate (Thermo Scientific) o SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific), exponiendo una película de autorradiografía (Fujifilm) sobre la membrana de PVDF.

Para analizar las imágenes obtenidas por quimioluminiscencia es necesario digitalizarlas mediante un escáner de alta resolución. Para determinar la cantidad relativa de proteína en cada muestra se utiliza el programa Image J que detecta la cantidad de píxeles de la imagen de la proteína en todas las muestras de una misma placa radiográfica. El área de medición debe ser igual para todas las muestras. Estos valores se relativizan respecto al control de carga (GAPDH o TUBULINA). El valor final es normalizado respecto al grupo control de cada experimento que recibe el valor 1.



### 11.4.2. Fluorescencia:

La membrana de PVDF se incubaba en agitación durante 1h RT en SEA BLOCK Blocking Buffer (Thermo Scientific), A continuación, se hibrida con el anticuerpo primario, según las diluciones especificadas (tabla 17), ON a 4° C y en agitación. Al día siguiente, se hibrida con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo tipo DyLight TM (Thermo Scientific) (tabla 18), durante 1h RT y en agitación. Tanto el anticuerpo primario como el secundario se incuban con una solución de dilución de anticuerpo (SEA BLOCK con 0,1% Tween-20, aunque al secundario es necesario adiocionarle SDS a una concentración del 0,01%. Las membranas de PVDF se dejan secar y se escanean utilizando el sistema LI-COR Odyssey. Para su visualización se emplea el Odyssey Imager con el que también es posible realizar una cuantificación directa de los valores de fluorescencia obtenidos.

Tabla 17. Lista de anticuerpos primarios para la inmunodetección por quimioluminiscencia o fluorescencia.

Anticuerpo	Fuente	Dilución WB	Referencia
Mst3	Rabbit polyclonal	1:1000	#3723 Cell Signaling
Mst3 [EP1468Y]	Rabbit monoclonal	1:1000 1:50 IP	#ab51137 Abcam
Mst4	Rabbit monoclonal	1:20000	#2049-1 Epitomics
Phospho-Mst4+MST3+STK25 (Thr178+Thr190+Thr174)	Rabbit polyclonal	1:500	#bs-103441R Bioss
<b>Insulin Receptor B (L55B10)</b>	Mouse monoclonal	1:1000	#3020 Cell Signaling
Phospho-IGF-I Receptor B (Tyr1135/1136)/Insulin <b>Receptor B (Tyr 1150/1151)</b> (19H7)	Mouse monoclonal	1:1000	#3024 Cell Signaling
IRS-1 (D23G12)	Rabbit monoclonal	1:1000	#3407 Cell Signaling
IRS-1 (L3D12)	Mouse monoclonal	1:1000 1:100 IP	#3194 Cell Signaling
Phospho-IRS1 (Tyr608) mouse/(Tyr612) human	Rabbit polyclonal	1:1000	#09-432 Millipore
AKT pan (40D4)	Mouse monoclonal	1:2000	#2920 Cell Signaling
Phospho-AKT (Thr308) (244F9)	Rabbit monoclonal	1:1000	#4056 Cell Signaling
Phospho-AKT (SER473)	Rabbit polyclonal	1:1000	#9271 Cell Signaling
FOXO1 (C29H4)	Rabbit monoclonal	1:1000	#2880
Phospho FOXO1 (Ser256)	Rabbit polyclonal	1:1000	#9461 Cell Signaling

## Material y Métodos

Phospho- FOXO1 (Thr24)/FOXO3a (Thr32)	Rabbit polyclonal	1:1000	#9464 Cell Signaling
<b>AMPK<math>\alpha</math></b>	Rabbit polyclonal	1:1000	#2532 Cell Signaling
Phospho- <b>AMPK<math>\alpha</math> (Thr172)</b> (40H9)	Rabbit monoclonal	1:1000	#2535 Cell Signaling
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP™	Rabbit monoclonal	1:1000	#4370 Cell Signaling
ERK5	Rabbit polyclonal	1:1000	#3372 Cell Signaling
HA Hibridoma Ca25	Mouse monoclonal	<b>1 <math>\mu</math>g Ab/ 1 mg</b> proteína IP	Producción propia
GSK-3 $\beta$ (D5C5Z) XP®	Rabbit monoclonal	1:1000	#12456 Cell Signaling
Phospho-GSK-3 $\beta$ (Ser9) (5B3)	Rabbit monoclonal	1:1000	#9323 Cell Signaling
CREB (48H2)	Rabbit monoclonal	1:1000	#9197 Cell Signaling
Phospho-CREB (Ser133) (1B6)	Mouse monoclonal	1:1000	#9196 Cell Signaling
GAPDH (6C5)	Mouse monoclonal	1:5000	#CB1001 Calbiochem
$\alpha$ -Tubulin B-5-1-2	Mouse monoclonal	1:2000	#T5168 Sigma
pNDRG1 (T346) (D98G11) XP (R)	Rabbit monoclonal	1:1000	#5482 Cell Signaling
pS6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (2F9)	Rabbit monoclonal	1:1000	#4856 Cell Signaling

Tabla 18. Lista de anticuerpos secundarios para la inmunodetección por quimioluminiscencia o fluorescencia.

Anticuerpo	Fuente	Dilución WB	Referencia
Goat Anti-Rabbit IgG, DyLight™ 800	Goat	1:15000	#35571 Thermo Scientific
Goat Anti-Mouse IgG, DyLight™ 680	Goat	1:15000	#35518 Thermo Scientific
Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Goat Polyclonal	1:2500	#p 0448 Dako Cytomation
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)/HRP	Goat	1:2000	#31430 PIERCE
Peroxidase-conjugated IgG Fraction, Anti-Rabbit IgG, Light Chain Specific	Mouse Monoclonal	1:5000	#211-032-171 Jackson ImmunoResearch
Alexa Fluor® 488 goat anti- rabbit IgG (H+L)	Goat	1:250 IF	Invitrogen

## 12. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS MÚLTIPLES

Se realizó en paralelo la determinación de los niveles relativos de fosforilación proteica de células HepG2 shcontrol en comparación con las células shMst3. Para ello se adquirió un kit comercial (*HUMAN phospho-Kinase Array Kit*, R&D Systems) consistente en membranas de PVDF con anticuerpos adheridos para la fosforilación de las principales quinasas celulares (tabla 19). La preparación de los extractos fue la misma que se describe en el apartado 11.1 y los subsiguientes pasos se realizaron siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. El análisis de las imágenes se realizó con el software Image J.

Tabla 19. Listado de anticuerpos para las quinasas y sus sitios de fosforilación incluidos en el *HUMAN phospho-Kinase Array*.

Membrana/ Coordenada	Diana/ Control	Sitio de fosforilación
A-A1, A2	Punto de referencia	—
A-A3, A4	<b>p38<math>\alpha</math></b>	T180/Y182
A-A5, A6	ERK1/2	T202/Y204, T185/ Y187
A-A7, A8	JNK 1/2/3	T183/Y185, T221/ Y223
A-A9, A10	GSK-3 $\alpha$ /B	S21/S9
B-A13, A14	p53	S392
B-A17, A18	Punto de referencia	—
A-B3, B4	EGF R	Y1086
A-B5, B6	MSK1/2	S376/S360
A-B7, B8	<b>AMPK<math>\alpha</math>1</b>	T183
A-B9, B10	Akt 1/2/3	S473
B-B11, B12	Akt 1/2/3	T308
B-B13, B14	p53	S46
A-C1, C2	TOR	S2448
A-C3, C4	CREB	S133
A-C5, C6	HSP27	S78/S82
A-C7, C8	<b>AMPK<math>\alpha</math>2</b>	T172
A-C9, C10	<b><math>\beta</math>-Catenin</b>	—
B-C11, C12	p70 S6 Kinase	T389
B-C13, C14	p53	S15
B-C15, C16	c-Jun	S63

A-D1, D2	Src	Y419
A-D3, D4	Lyn	Y397
A-D5, D6	Lck	Y394
A-D7, D8	STAT2	Y689
A-D9, D10	STAT5a	Y694
B-D11, D12	p70 S6 Kinase	T421/S424
B-D13, D14	RSK1/2/3	S380/S386/S377
B-D15, D16	Enos	S1177
A-E1, E2	Fyn	Y420
A-E3, E4	Yes	Y426
A-E5, E6	Fgr	Y412
A-E7, E8	STAT6	Y641
A-E9, E10	STAT5b	Y699
B-E11, E12	STAT3	Y705
B-E13, E14	p27	T198
B-E15, E16	PLC- $\gamma$ 1	Y783
A-F1, F2	Hck	Y411
A-F3, F4	Chk-2	T68
A-F5, F6	FAK	Y397
A-F7, F8	<b>PDGF RB</b>	Y751
A-F9, F10	STAT5a/b	Y694/Y699
B-F11, F12	STAT3	S727
B-F13, F14	WNK1	T60
B-F15, F16	PYK2	Y402
A-G1, G2	Reference Spot	—
A-G3, G4	PRAS40	T246
A-G9, G10	PBS (Control negativo)	—
B-G11, G12	HSP60	—
B-G17, G18	PBS (Control negativo)	—

### 13. INMUNOPRECIPITACIÓN

La cantidad de proteína utilizada para inmunoprecipitar varía según el experimento. En el caso de inmunoprecipitar proteína sobreexpresada en células Hek293 se consideró suficiente 500 µg de extracto total. En el caso de la inmunoprecipitación de Mst3 para ver su estado de fosforilación o su interacción con AKT se usaron 5 mg de proteína total. Los extractos se recogieron en tampón de lisis SAPK (*Stress activated protein kinase*): HEPES 20 mM pH 7,4/ EGTA 2 mM/ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM/ Triton X-100 1%/ Glicerol 10%/ β-glicerofosfato 50 mM. También se adicionaron las mismas cantidades de inhibidores de proteasas y fosfatasas que se describieron anteriormente para los otros tampones de lisis utilizados. Se siguió el protocolo:

- 1) Llevar la cantidad de extracto proteico a inmunoprecipitar a un volumen final de 500 µL del tampón de lisis SAPK.
- 2) Preaclara los extractos con un anticuerpo similar al de la proteína que se desea inmunoprecipitar pero que se sepa que no la reconoce. Añadir 30 µL de una matriz de G-Agarosa (Roche Diagnostics)/buffer SAPK (1:1) y mantener en agitación rotacional a 4°C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo centrifugar los extractos a 13.200 rpm durante 1 minuto y recoger el sobrenadante. De esta forma se elimina gran parte de las posibles uniones inespecíficas tanto a anticuerpo como a proteína G obteniendo mejores resultados.
- 3) Añadir al sobrenadante anterior el anticuerpo contra la proteína a inmunoprecipitar. De forma general la relación proteína/anticuerpo fue 1 mg/1 µg. En el caso de encontrarse el anticuerpo utilizado en un sobrenadante de hibridoma obtenido según el protocolo descrito por (Harlow and Lane 1988) se estima que son necesarios 100 µL de sobrenadante para tener 1 µg de anticuerpo. Mantener en rotación a 4°C durante 1 hora.
- 4) Añadir 30 µL de una suspensión 1:1 de matriz de proteína G-Agarosa/buffer SAPK y mantener en agitación rotacional a 4°C durante 2 horas. Es importante el equilibrado de la proteína G con el propio tampón de lisis, lo que se realiza lavando

tres veces el polímero en dicho buffer. También es importante que el buffer contenga inhibidores de fosfatasas y proteasas.

- 5) Centrifugar a 13.200 rpm durante 1 minuto a 4° C.
- 6) Descartar el sobrenadante y lavar pellet con tampón SAPK con inhibidores. Centrifugar como en el paso anterior. Repetir este paso 3 veces.
- 7) Descartar el sobrenadante y aspirar bien toda la fase líquida con la ayuda de una jeringa muy fina.
- 8) Añadir tampón de carga Laemmli 2x.
- 9) Hervir las muestras inmunoprecipitadas a 95° C durante 10 minutos.

Las muestras desnaturalizadas se cargan en un gel de electroforesis SDS-PAGE y se procede como se describe en el apartado 11.

#### **14. AISLAMIENTO DE BALSAS LIPÍDICAS (*LIPID RAFTS*)**

Para el aislamiento de las balsas lipídicas (*lipid rafts*) se procedió según el protocolo descrito por (Solomon, Mallory et al. 1998). El protocolo se basa en tratar los extractos celulares con dos tipos de tampones de lisis consecutivos que consiguen el fraccionamiento celular. El protocolo es el siguiente:

- 1) Lavar las células con PBS y aspirar.
- 2) Tripsinizar y recoger las células en medio de cultivo para inactivar la tripsina.
- 3) Centrifugar a 900 rpm durante 5 minutos y aspirar el sobrenadante.
- 4) Lavar el pellet con PBS frío.
- 5) Centrifugar a 900 rpm durante 5 minutos y aspirar.

- 6) Añadir un volumen determinado de **tampón de lisis A** (MES (Sigma-Aldrich) 25 mM/ NaCl 150 mM pH 6,5). Resuspender el precipitado celular mediante pipeteo.
- 7) Añadir en proporción 1:1 **tampón de lisis A-T** (Mes 25 mM/ NaCl 150 Mm pH 6,5/ Tritón X-100 2%/ PMSF 2 mM).
- 8) Incubar los extractos en hielo durante 30 min.
- 9) Centrifugar a 8000 rpm durante 20 minutos a 4º C. El sobrenadante constituye la **fracción soluble** y el precipitado **la fracción insoluble**.
- 10) Retirar el sobrenadante (fracción soluble) y guardar a -80º C.
- 11) Resuspender el precipitado (fracción insoluble) **en tampón de lisis B** (Tritón X-100 1%/ Tris-HCl 10 mM pH 7,6/NaCl 500 mM/ PMSF 2 Mm/ *Octylglucoside* (Sigma-Aldrich) 60 mM).
- 12) Incubar los extractos en hielo durante 30 min.
- 13) Centrifugar a 8000 rpm durante 20 minutos a 4º C. El sobrenadante constituye la **fracción insoluble**.
- 14) Retirar el sobrenadante (fracción insoluble) y guardar a -80ºC.

A continuación se procedió a la inmunoprecipitación de las proteínas deseadas según el protocolo descrito en el apartado 13.



## 15. ANALISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPad, aplicando un test t de Student cuando se comparaban dos grupos, y un análisis ANOVA con corrección de Bonferroni pos-hoc cuando se comparaban más de dos grupos. Todas las gráficas representan la media y en el error estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. Siempre que el p-valor resultante de la comparación fuera inferior a 0,05, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas.





# RESULTADOS



## 1. PUESTA A PUNTO DEL MODELO CELULAR

Para abordar la posible función de Mst3 en el metabolismo de la glucosa, el modelo elegido en primer lugar fue la línea celular de hepatocarcinoma (HepG2) debido a su disponibilidad, fácil cultivo y a que ha sido ampliamente empleada en estudios del campo del metabolismo. Lo primero que se propuso fue obtener una línea estable de células HepG2 con niveles proteicos disminuidos no sólo de Mst3 sino también de su homóloga Mst4 y una línea HepG2 control. Para ello se infectaron las células con lentivirus felinos defectivos que codifican un shRNA dirigido contra una secuencia específica de cada uno de los genes de interés (shMst3, shMst4) y un shRNA inespecífico (shControl). Se seleccionaron las células que habían integrado el correspondiente shRNA mediante puromicina y se recogieron proteínas para determinar la eficiencia del silenciamiento por *Western Blot* (WB). Como se observa en la figura 23A los niveles proteicos de Mst3 y Mst4 fueron reducidos satisfactoriamente. La PCR cuantitativa (qPCR, *quantitative Polymerase Chain Reaction*) o PCR en tiempo real en el caso de la figura 23B muestra niveles de RNA mensajero (mRNA) de Mst3 significativamente menores en las células shMst3 con respecto a las shControl.

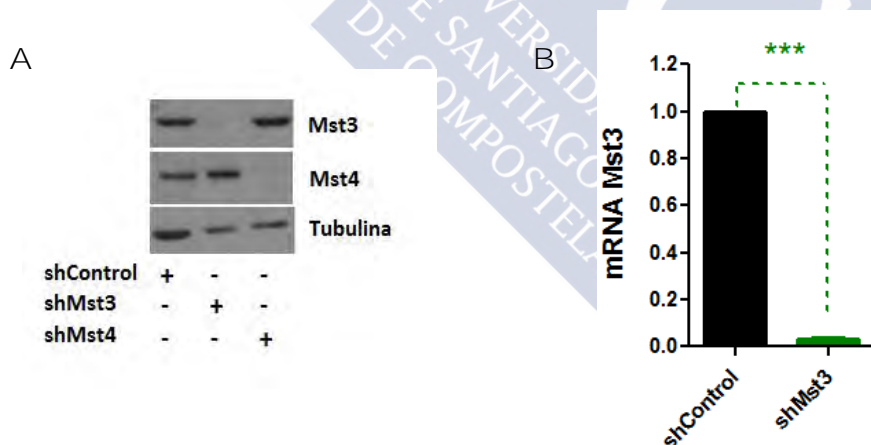


FIGURA 23. Silenciamiento de Mst3 en células HepG2. Se sembraron las células en medio completo y se recogieron extractos tras 72 horas en cultivo. A. WB de Mst3 y Mst4 de células HepG2 transducidas con lentivirus que codifican shRNAs para Mst3, Mst4 y un shControl. Se muestra la tubulina como control de carga. B. Niveles de mRNA de Mst3 en células HepG2 shMst3 relativos a células shControl. Los niveles de mRNA se midieron mediante qPCRse corrigieron por mRNAs control o *housekeeping* GAPDH y RPLP0. (test t, 2 colas), (n= 3 experimentos,  $p < 0,0001$ ).

Una vez establecidas las líneas HepG2 shControl, shMst3 y shMst4 con niveles reducidos de mRNA y proteína de Mst3 y Mst4, se llevó a cabo un estudio preliminar acerca de la posible implicación de estas quinasas en metabolismo. Para ello se eligieron cinco genes correspondientes a cinco enzimas representativas de los procesos metabólicos más relevantes y se realizó una PCR a tiempo real para estudiar cómo se afectaba su expresión:

**-ACAC** (*Acetyl-CoA Carboxylase Alpha*): También denominada ACC, la acetil-CoA carboxilasa es una enzima que contiene biotina y cataliza la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA, un paso limitante en la velocidad de síntesis de ácidos grasos.

**-FASN** (*Fatty Acid Synthase*): La ácido graso sintasa es una enzima multifuncional cuya función principal es catalizar la síntesis de palmitato desde acetil-CoA y malonil-CoA, en presencia de NADPH, a ácidos grasos de cadena larga.

**-CPT1A** (*Carnitine Palmitoyl Transferase 1A (liver)*): Conocida como CPT I, la carnitina palmitoil transferasa es una enzima clave en la beta-oxidación de los ácidos grasos pues participa en el transporte de los mismos a través de la membrana mitocondrial interna en un proceso de dependiente de carnitina.

**-G6PC** (*glucose-6-phosphatase, catalytic subunit*): Glucosa-6-fosfatasa (*G6Pasa*) es una proteína integral de membrana del retículo endoplásmático que consta de varias subunidades. Su subunidad catalítica hidroliza la D-glucosa 6-fosfato a D-glucosa y ortofosfato y es por tanto una enzima clave en la homeostasis de la glucosa participando en la gluconeogénesis y glucogenolisis.

**-PCK1** (*phosphoenol pyruvate carboxykinase 1*): Fosfoenol piruvato carboxilasa (*PEPCK1*) es el principal punto de control para la regulación de la gluconeogénesis. Es una proteína citosólica que utiliza GTP para catalizar la formación de fosfoenol piruvato a partir de oxalacetato liberando dióxido de carbono y GDP.

## 2. LA EXPRESIÓN DE GENES GLUCONEOGENÉTICOS ESTÁ AFECTADA POR EL SILENCIAMIENTO DE Mst3

Se sembraron y recogieron extractos de células HepG2 tras 72 horas en cultivo para el análisis de los niveles de mRNA en las dos poblaciones de células HepG2 shMst3 y shMst4 con respecto a las células shControl. La qPCR de estos genes metabólicos reveló diferencias significativas en las enzimas gluconeogénicas *G6PC* y *PCK1* en las poblaciones con bajos niveles de Mst3 (figura 24) lo que abría una ventana interesante al estudio del papel de Mst3 en la regulación de la gluconeogénesis.

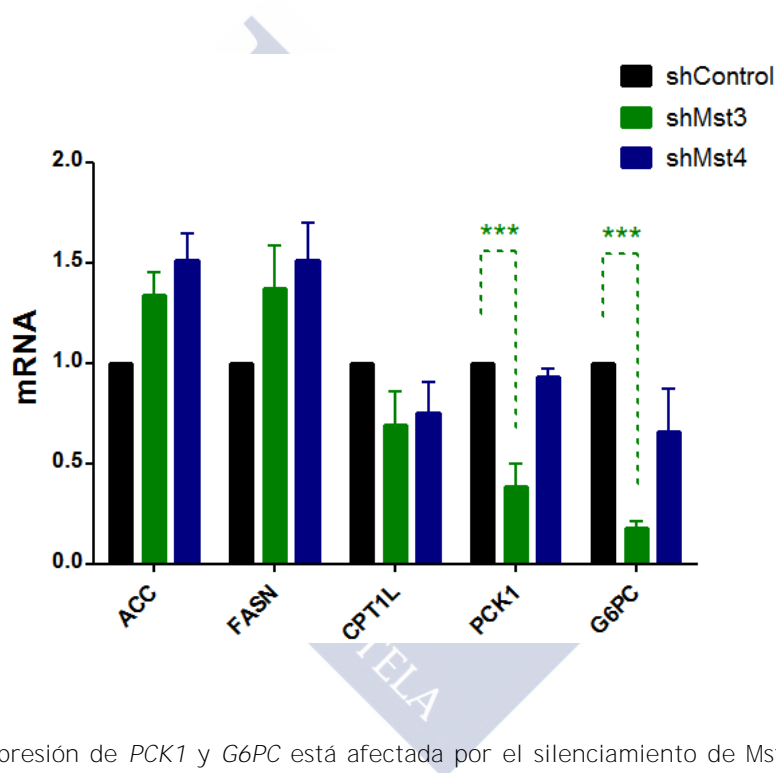
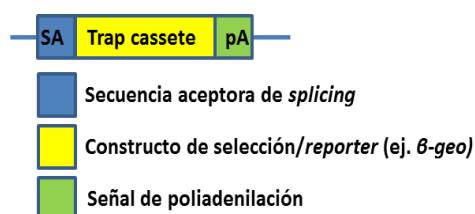


FIGURA 24. La expresión de *PCK1* y *G6PC* está afectada por el silenciamiento de Mst3. Tras 72 horas en cultivo sin cambiarles el medio, se recogieron extractos de las poblaciones shControl, shMst3 y shMst4 y se midieron los niveles de mRNA de los genes metabólicos indicados mediante qPCR y relativos a las células shControl. Los resultados se normalizaron con respecto a los niveles de mRNA de *RPLP0* y *GAPDH* como controles de carga. (ANOVA, 2 colas con corrección de Bonferroni), (n=5 experimentos, \*\*\* p<0,001).

### 3. PUESTA A PUNTO DEL MODELO ANIMAL.

Con los resultados preliminares observados en las células HepG2 que apuntaban a una posible regulación de la gluconeogénesis por Mst3, el siguiente paso fue comprobar esta hipótesis en un modelo *in vivo* con ratones deficientes en Mst3 de forma equivalente a lo realizado con el modelo celular HepG2 shMst3. Se trata de ratones modificados genéticamente mediante el sistema *Gene Trapping*. Este método consiste en la generación de células madre embrionarias (*ES, embryonic stem cells*) con inserciones al azar en su DNA genómico de un vector que contiene un aceptor de *splicing* (*SA, Splicing Acceptor*), una secuencia que permite la selección (*Trap cassette*) y un sitio de poliadenilación (*pA, poliAdenilation*) (figura 25A). Este vector sólo se expresa cuando se inserta en un intrón de un gen que se esté expresando. En este caso, la señal aceptora de *splicing* permite que la secuencia del vector sea reconocida por la maquinaria de *splicing* endógena y se incorpore al mRNA, mientras que la señal de poliadenilación en el extremo 3' causa la parada de la transcripción dando lugar a un mRNA truncado y por tanto la traducción a una proteína de fusión no funcional. Las inserciones del vector cerca del extremo 5' tienen mayor probabilidad de inactivar completamente al gen que las inserciones en extremo 3'. La secuencia de selección permite crecer y aislar aquellas células en las que el vector se haya insertado en el intrón de un gen expresado, y mediante la técnica de 5' RACE con cebadores apropiados se puede identificar el mRNA producto y así identificar el gen que ha sido truncado (Stanford, Cohn et al. 2001) (figura 25B).

A





B

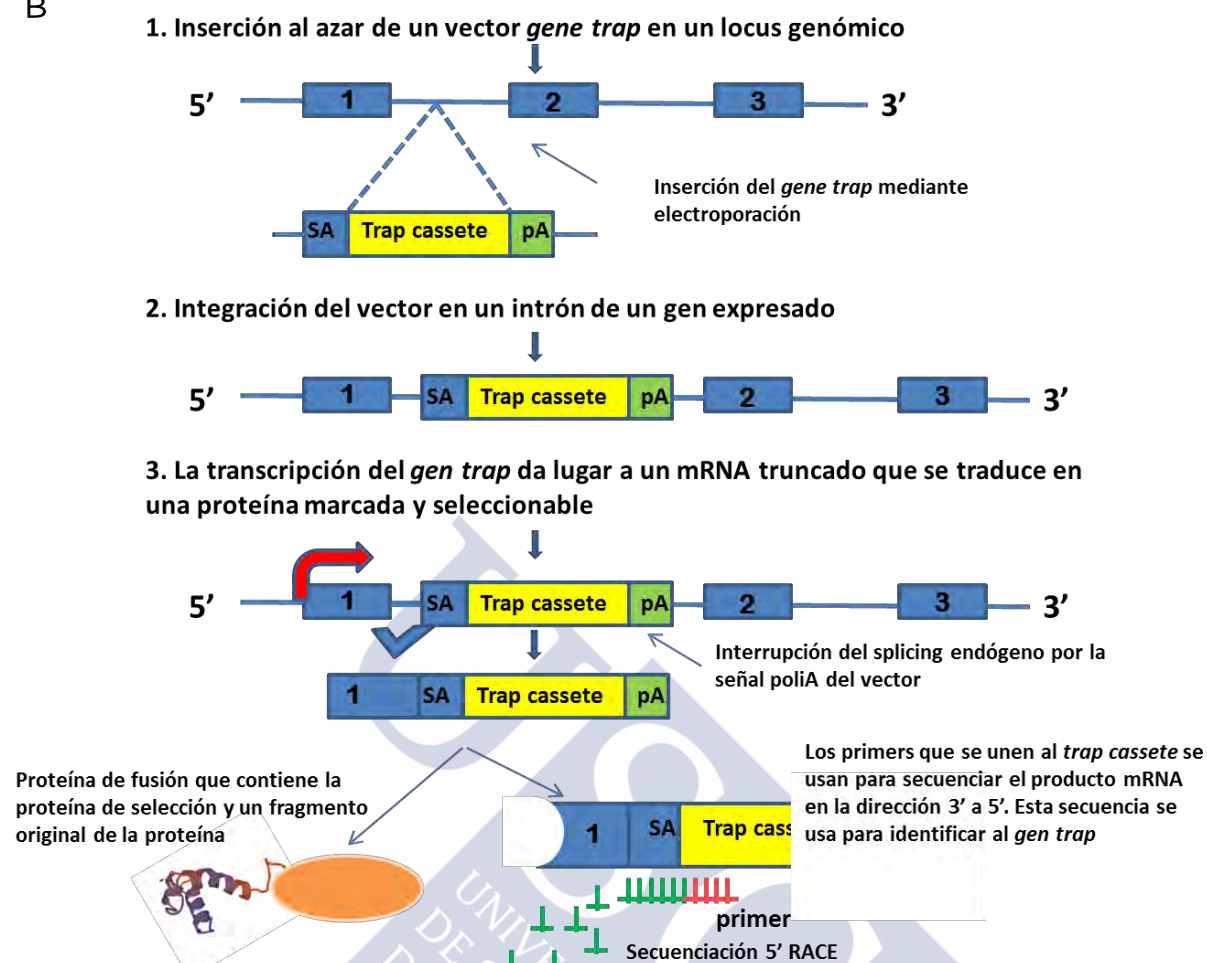


FIGURA 25. A. Esquema de un vector *gene trap* estándar. B. Proceso convencional de *gene trapping* mediante el que fueron generados los ratones Mst3 deficientes. Adaptado de <http://www.genetrap.org/tutorials/overview.html>

Una vez adquirida la línea celular *gene trap* para Mst3 del Consorcio Internacional del *Gene Trap* (IGTC, *International Gene Trap Consortium*), se encargó al Parque de Investigación Biomédica de Barcelona (PRBB) la obtención de animales mediante la introducción de estas células (tipo 129/OLA) en el blastocisto de una hembra donante C57BL/6J (pelaje negro) que se implanta en una hembra hospedadora. Las células madre embrionarias se integran colonizando varios tejidos del embrión en desarrollo y si la colonización incluye células germinales, el ratón resultante transmitirá el alelo mutante a la descendencia. Puesto que las células 129/OLA son homocigotas para el locus *agouti* (color marrón), la cantidad de *agouti* presente en la descendencia quimérica suele ser un indicador de la probabilidad de

que el genoma de las ES haya colonizado la línea germinal. Las quimeras obtenidas se cruzaron con ratones C57BL/6J con transmisión exitosa del vector en la línea germinal dando lugar a camadas de fondo mixto. De estos animales, aproximadamente el 50% fueron heterocigotos para la mutación, los cuales fueron adquiridos por nuestro laboratorio que inició una colonia Mst3 deficiente (figura 26).

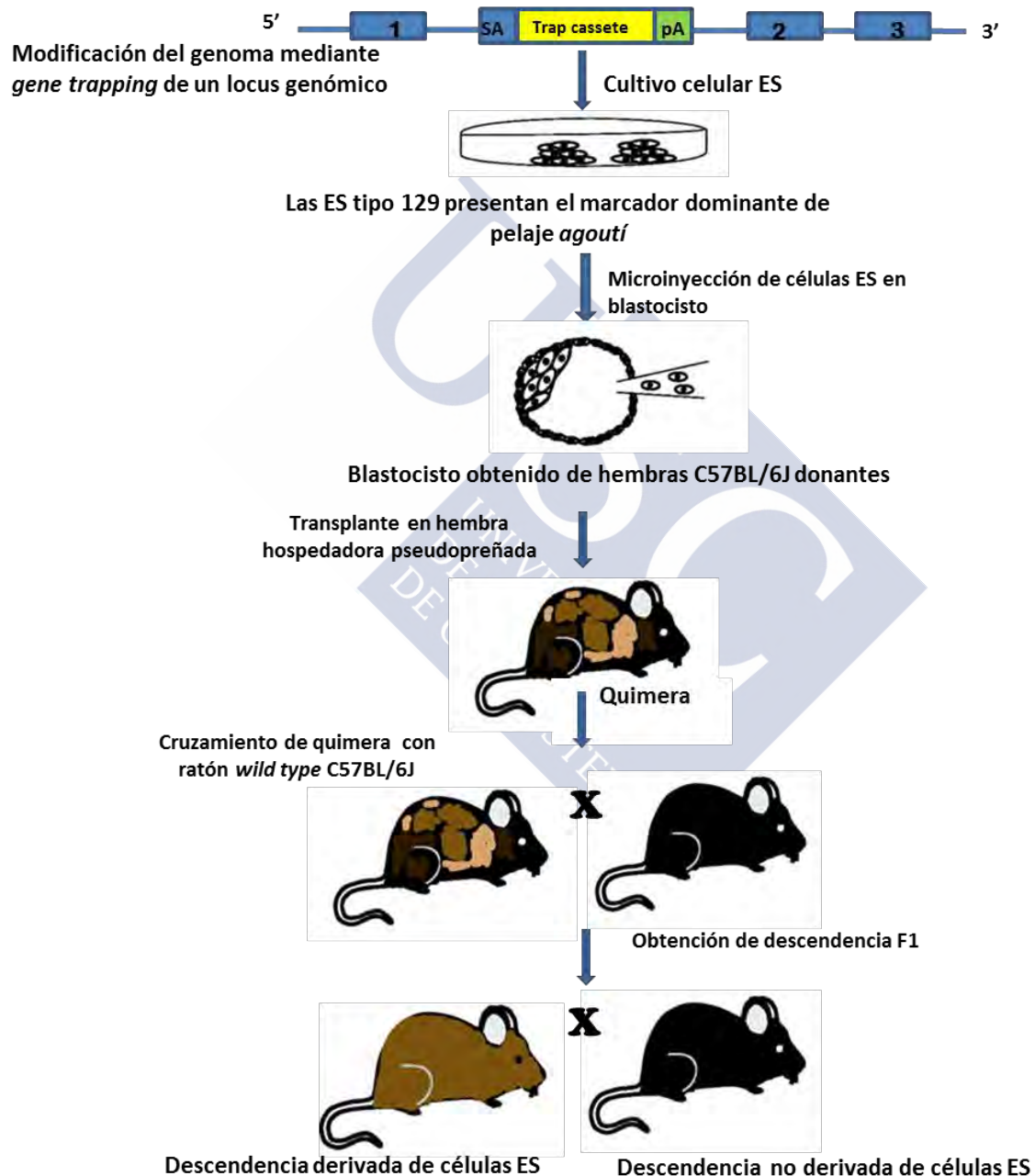


FIGURA 26. Esquema del proceso de obtención de ratones con *gene trap* en su genoma. Adaptado de (Adams and van der Weyden 2008).

La limitación de este tipo de ratones generados mediante el sistema *gene trapping* radica en el hecho de que se desconoce la localización exacta donde se insertó el vector dentro del gen diana. La única información de la que se disponía era que el vector se había insertado en algún lugar a lo largo de las 29 Kb del intrón 2 de Mst3. Por ello, el primer método de genotipado que se empleó consistía en la realización de una reverso transcripción seguida de PCR convencional (RT-PCR) partiendo de mRNA extraído de la cola del ratón. Se usaron para ello tres oligonucleótidos o cebadores que reconocieran al cDNA de Mst3: un cebador directo (*forward*) situado en el extremo 3' del exón 1 de Mst3, un cebador reverso en el exón 2 (ambos amplificaban un fragmento en el **alelo salvaje o normal (WT, Wild Type)**), y un último cebador reverso situado en el vector insertado que en combinación con el cebador directo del exón 1 genera un fragmento correspondiente al **alelo mutado (GT, Gene Trap)** (figura 27). Cada pareja de estos oligos amplificaba dependiendo del mRNA un fragmento de distinto tamaño (tabla 20).

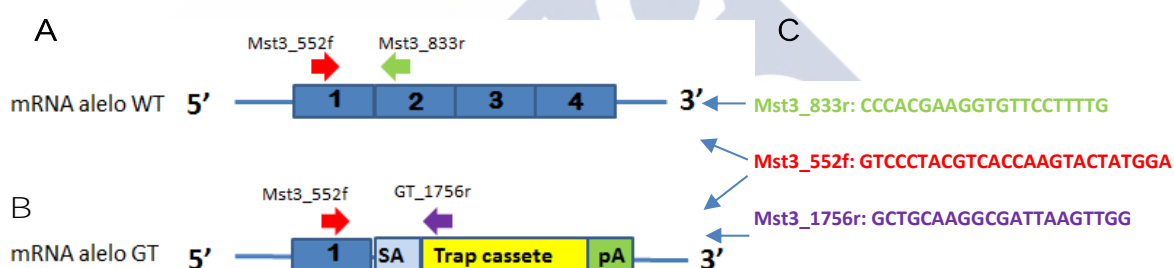


FIGURA 27. A. mRNA original WT de Mst3. B. mRNA quimérico compuesto por el primer exón de Mst3 y la inserción del vector. C. Para detectar ambos transcritos se necesitaron 3 oligonucleótidos. Adaptado de <http://www.sanger.ac.uk/genetrap/>

TABLA 20. Combinaciones de cebadores generan 2 fragmentos de distinto tamaño dependiendo del mRNA.

Oligos	mRNA alelo WT	mRNA alelo GT
Mst3_552f x Mst3_833r	282 bp	-
Mst3_552f x Mst3_1756r	-	205 bp

El genotipado de los ratones a partir de mRNA con estas combinaciones de oligonucleótidos solamente proporcionaba los genotipos normal o heterocigoto. Sin

embargo, en algunos de los que se consideraban heterocigotos, el alelo normal no generaba bandas con la misma intensidad que otros, lo que hacía pensar que se podrían tratar de homocigotos enmascarados (figura 28, flecha azul). En animales generados con estrategias de tipo *Gene Trap* a veces ocurre que un porcentaje de los mRNAs procedentes del alelo mutado no contienen el vector insertado, por no haberlo reconocido la maquinaria de *splicing* como un exón, un fenómeno que se ha llamado ***splicing around***. En ese caso los alelos son realmente **hipomórficos**, no tienen su función totalmente inactivada y son capaces de generar ciertos niveles de mRNA y proteína Mst3.

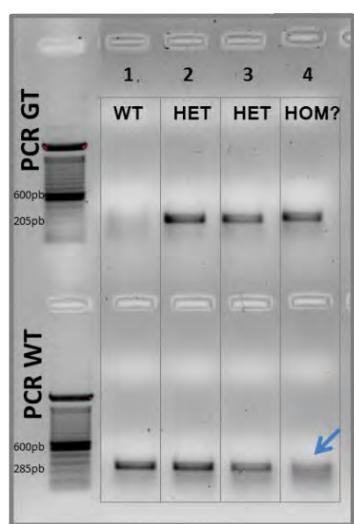


FIGURA 28. PCR convencional mostrando el genotipado de 4 ratones. 1: WT, 2,3: heterocigotos, 4: falso heterocigoto, es capaz de producir ciertos niveles de Mst3 normal debido al *splicing around* a pesar de que a nivel genómico presentaría inserción del vector en ambos alelos.

Para saber si el alelo mutado de Mst3 estaba produciendo *splicing around*, y en ese caso identificar los homocigotos, fue necesario investigar el lugar exacto dentro del intrón 2 de Mst3 donde se insertó el vector y así poder diseñar unos oligonucleótidos adecuados para genotipar a nivel de DNA genómico. La estrategia a seguir para determinar el lugar de inserción del vector dentro del intrón 2 de Mst3 fue la siguiente:

1. Para saber cómo de íntegro estaba el vector insertado fue necesario amplificar distintas regiones del mismo mediante la combinación de varios cebadores directos con algunos cebadores reversos de manera que toda la longitud de secuencia teórica del vector pudiera ser amplificada mediante PCR convencional (figura 29A). La combinación que dio más información fue la de los cebadores GT10\_8f y el GT10\_396r que generaron un

fragmento de 388 pares de bases (figura 29B). Puesto que el oligo pGT10\_8f se encuentra en el extremo 5' del vector, esto nos indicaba que el vector se insertó de forma muy íntegra.

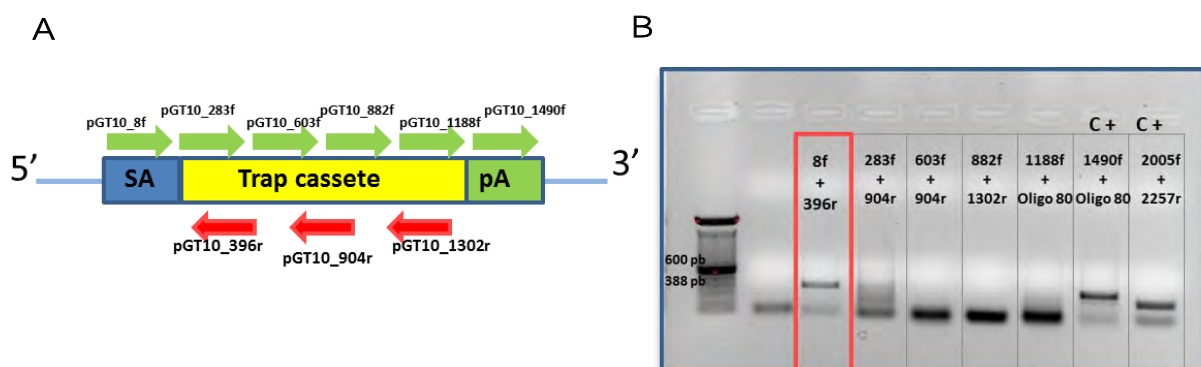


FIGURA 29. El vector insertado en el intrón 2 de Mst3 está íntegro. A. Conjunto de cebadores sobre la secuencia teórica usados para comprobar la integridad del vector insertado. 6 oligos directos (pGT10\_8f a pGT10\_1490f) (flechas verdes) y 3 oligos reversos (flechas rojas). B. PCR convencional de 5 combinaciones de cebadores directos con los reversos correspondientes a la secuencia del vector. Se usó como molde para amplificar, el ADN de un ratón heterocigoto para la inserción del vector y de genotipo previamente conocido. Se incluyeron dos controles positivos con cebadores que amplificaban fragmentos conocidos dentro del vector

2. Una vez se comprobó que el vector se había insertado correctamente, se seleccionó el oligo reverso pGT10\_396r de dirección 3'→5' más cercano al extremo del lugar de inserción. A continuación se diseñó mediante un programa de diseño de oligonucleótidos (*Bio Edit*) una batería de oligos directos cada 500 pb a lo largo de las 29000 pb del intrón 2 de Mst3 donde se sabía que estaba el vector (figura 30).

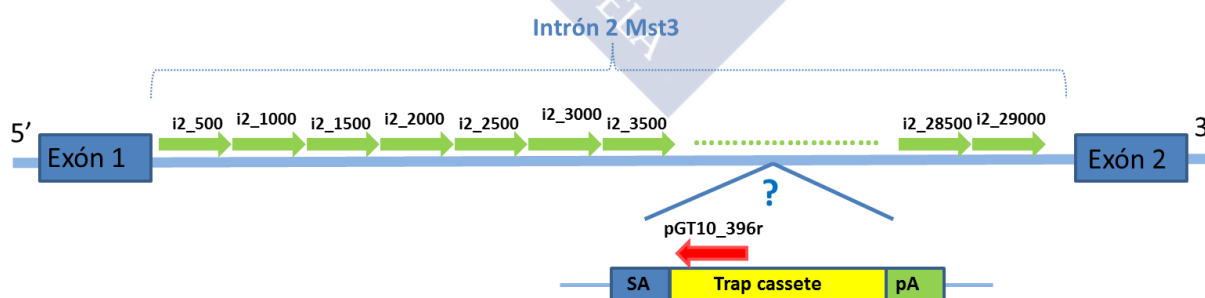
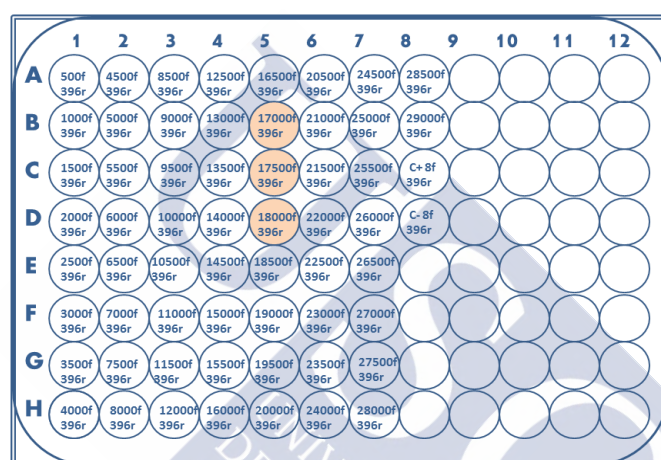


FIGURA 30. Esquema de la región génica del intrón 2 de Mst3 dónde se produjo la inserción del vector, flanqueado por los exones 1 y 2. Se indica con una interrogación el posible lugar de inserción del vector. Para la determinación del sitio exacto se diseñaron 58 oligos directos en el intrón 2 (i2\_500 a i2\_29000), que se combinaron uno a uno con el cebador reverso 396r correspondiente al extremo 5' del vector (flecha roja).

3. El oligo reverso GT10\_396r se usó en 58 combinaciones con los 58 oligos directos correspondientes a fragmentos de la secuencia del intrón 2 de Mst3 (figura 30) y se sometieron a una qPCR tipo **Sybr Green** con el DNA molde de un ratón heterocigoto para buscar la combinación que amplificase un fragmento adecuado y así determinar el lugar exacto de inserción del vector (figura 31A). El análisis de los valores obtenidos mediante esta PCR reveló que la pareja de cebadores que amplificaba un fragmento válido era la formada por **i2\_17500** directo con **pGT10\_396** reverso, indicando así la localización más probable en pares de bases para la inserción del vector (figura 31B).

A



B

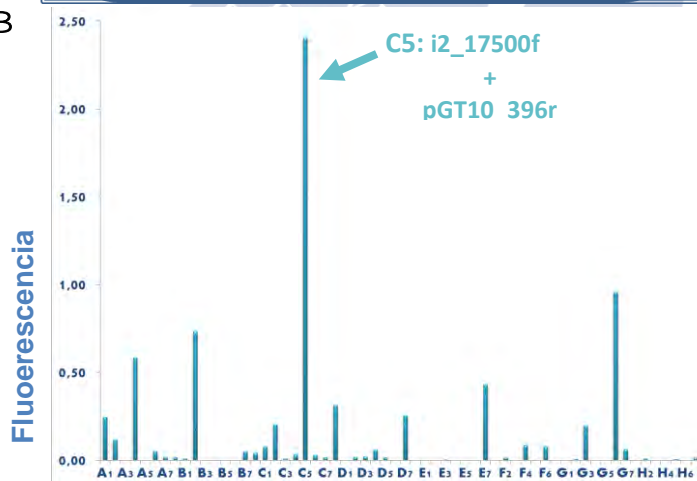


FIGURA 31.A. Esquema de las 58 combinaciones de oligos directos del intrón de Mst3 con el oligo reverso pGT10\_396 del vector empleadas para la amplificación por *Syber Green*. Se usó como molde para amplificar el ADN de un ratón heterocigoto para el vector de genotipo previamente conocido. Se usó como control positivo la pareja de oligos pGT10\_8f con pGT10\_396r y se puso un control negativo con la misma pareja y H<sub>2</sub>O. B. Cuantificación relativa de los productos de PCR con las distintas parejas. Se observa (flecha azul) que la pareja de oligos correspondiente a la posición C5 amplificó el producto de mayor señal fluorescente.



4. Una vez localizado el sitio de inserción del vector en torno a las 17500 pares de bases del intrón 2 de Mst3, se realizó una PCR convencional con el cebador directo i2\_17500, los cebadores correspondientes a las regiones adyacentes 500 pares de bases hacia 5' y 500 pares de bases hacia 3', es decir (i2\_17000 directo y i2\_18000 reverso) (figura 31A, pocillos color rosado). Además, se incluyeron en esta PCR otros cebadores que habían generado una señal abundante en la PCR fluorescente. Con esta PCR convencional se esperaba confirmar que se amplificaba un fragmento de tamaño adecuado correspondiente a un pequeño tramo del intrón junto con las 396 pares de bases correspondientes al tramo de vector que amplificaba el cebador reverso pGT10\_396r. Se observó que la combinación i2\_18000 pb con el pGT10\_396r generaba un fragmento de 500 pares de bases que acotaba todavía más el posible lugar de mutación. Los oligonucleótidos de las posiciones inmediatas 17500 y 17000 pb generaron fragmentos de 1000 y 1500 pb respectivamente, lo que apoyaba a la posición 18000 como la más cercana al inicio del vector (figura 32).

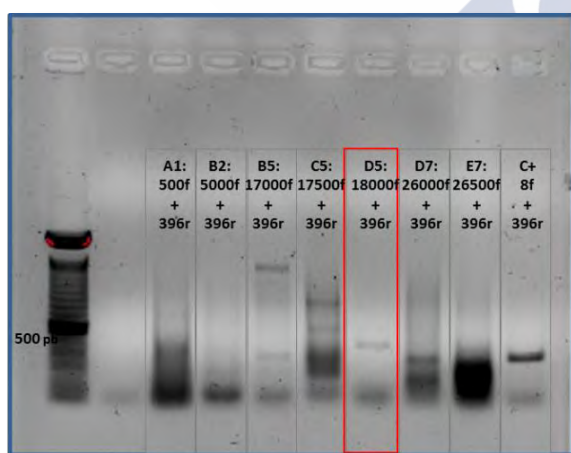


FIGURA 32. PCR convencional que confirma el fragmento de tamaño adecuado. Se muestran las combinaciones de cebadores directos de mayor probabilidad para la inserción del vector y el cebador reverso pGT10\_396r. La combinación con los oligonucleótidos correspondientes a las regiones 17000, 17500 y 18000 pares de bases del intrón de Mst3, generaron fragmentos de 1500, 1000 y 500 pares de bases respectivamente indicando que la posición más cercana a la inserción del vector sería en torno a las 18000 pares de bases.

5. El siguiente paso fue extraer el fragmento de 500 pares de bases del gel de agarosa y una vez purificado se envió para su secuenciación a *Stab Vida* con los cebadores i2\_18000f y pGT10\_396r. Una vez recibidas ambas secuencias directa y reversa se alinearon mediante el programa Vector NTI® con la secuencia del vector a fin de detectar el lugar exacto de su inserción. Estas secuencias deberían contener no sólo nucleótidos correspondientes al



vector sino también algunos nucleótidos de la secuencia del intrón 2 de Mst3 inmediata al lugar de inserción (figura 33).

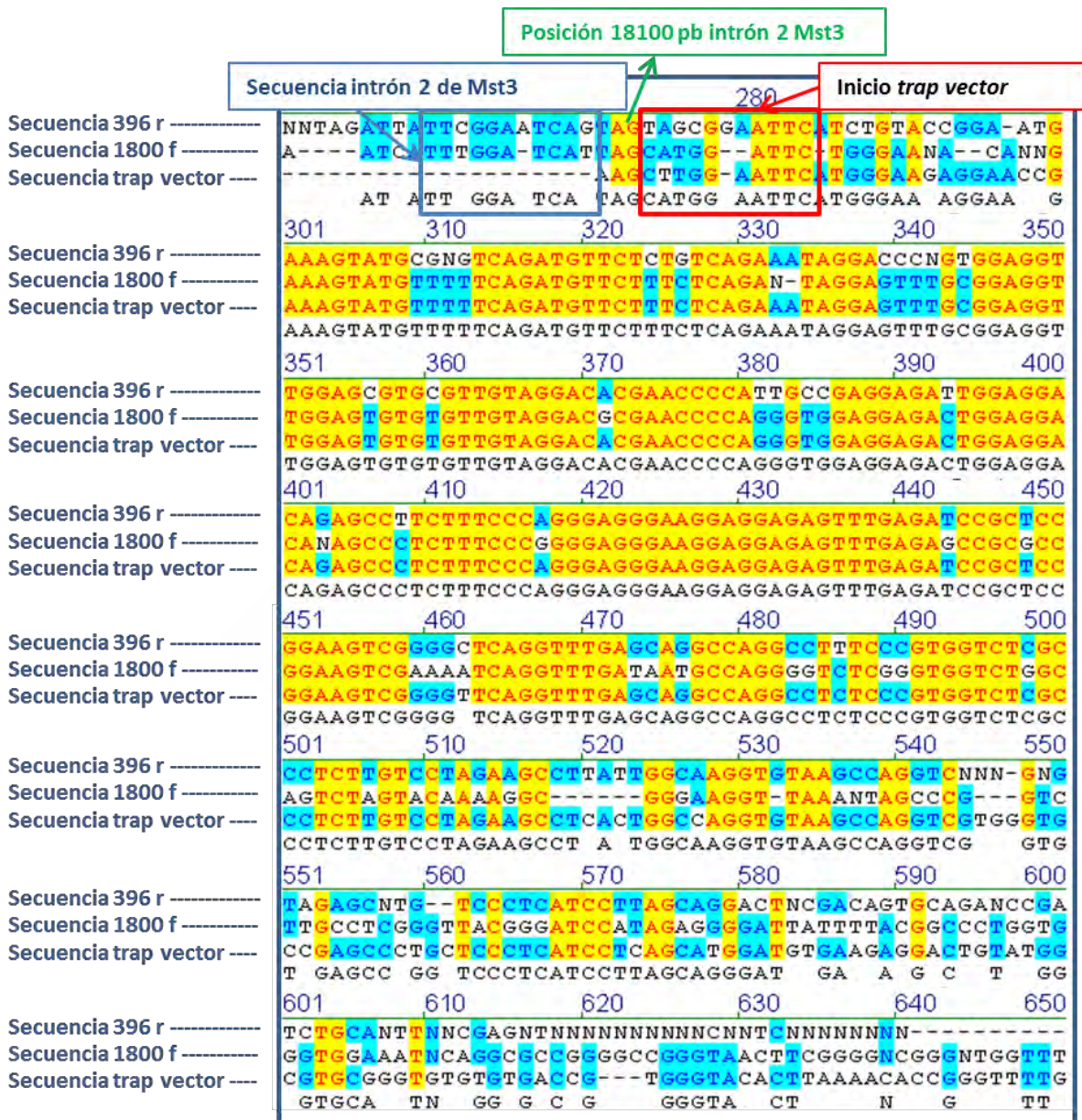


FIGURA 33. Fragmento de la alineación de la secuencia del vector con las secuencias de los productos de PCR amplificados con el primer i2\_18000f y el primer pGT10\_396r. Se muestra el lugar aproximado de inicio de la secuencia del vector donde coinciden las tres secuencias (encuadre rojo), precedido de una zona que no alinea con la secuencia del vector y se corresponde con ADN del intrón de Mst3 (encuadre azul). El lugar exacto de inserción del vector es en la posición 18100 (flecha verde).

6. Una vez localizada la posición exacta de inserción del vector, se diseñaron unos oligonucleótidos adecuados que amplificasen tanto el alelo normal como el alelo que

contiene la mutación. Estos oligonucleótidos fueron diseñados con un programa *Bio Edit* y consistieron en: un cebador directo que se sitúa en la posición 17941 del intrón de Mst3 a unas 159 pares de bases de la inserción del vector, un cebador reverso dentro de la secuencia del vector (Oligo GT), y otro cebador reverso situado en la posición 18245 de la secuencia del intrón 2 a unas 145 pares de bases del final de la inserción del vector (figura 34). La combinación del cebador directo con cada uno de los reversos amplifica el alelo salvaje o el alelo mutado (tabla 21).

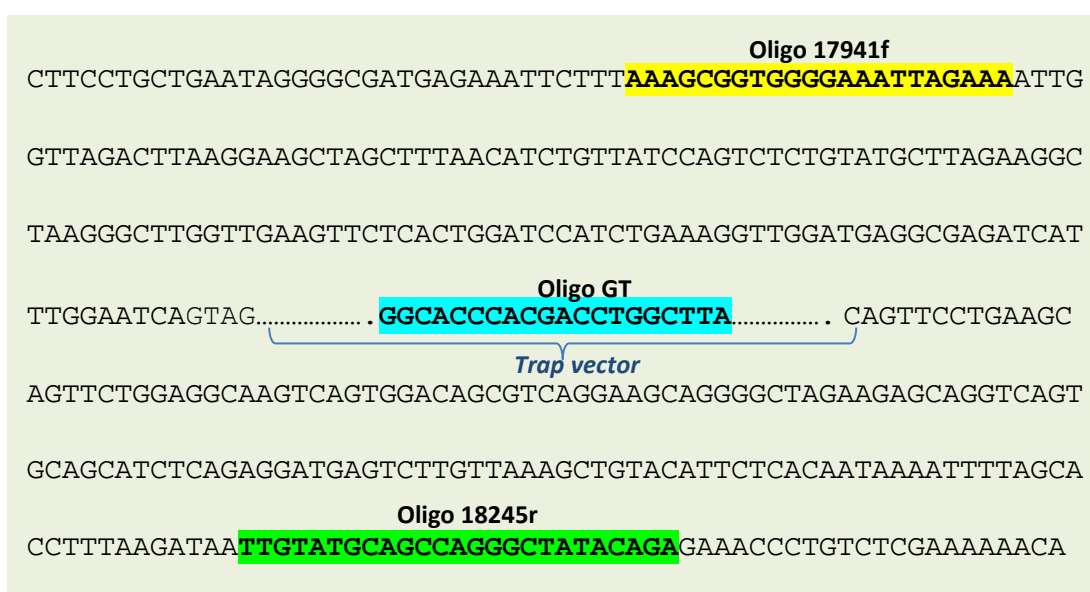


FIGURA 34. Fragmento de secuencia del intrón 2 de Mst3 comprendida entre los nucleótidos 17907 a 18292 mostrando el lugar de inserción del vector. En amarillo aparece la secuencia correspondiente al cebador directo (Oligo 17941f), en azul la secuencia del cebador reverso (Oligo GT). Ambos amplifican un tramo de 304 pares de bases del vector insertado. En verde los nucleótidos correspondientes al oligo reverso (Oligo 18245r) que amplifica con el directo un fragmento de 400 pares de bases del alelo normal.

Tabla 21. Combinaciones de 3 oligonucleótidos y fragmentos que se generan según sea alelo WT o GT.

Oligos	Alelo WT	Alelo GT
17941f x 18245r	304 pb	-
17941f x Oligo GT	-	~ 400 pb

Una vez situado exactamente el lugar de inserción del vector y con unos oligonucleótidos válidos se realizó una PCR convencional a partir del DNA genómico y se logró genotipar a los ratones que hubiesen incorporado el vector en su genoma de una

manera fiable (figura 35A). No obstante, esto constituía un genotipado preliminar puesto que como se explicaba anteriormente estos ratones no son mutantes completos y son capaces de producir ciertos niveles de Mst3 considerándose más bien ratones mutantes KD. La cantidad de Mst3 que pueden llegar a producir estos ratones que han incorporado el vector en su genoma es variable entre los distintos individuos. Por ello, fue necesario genotiparlos tras su sacrificio a nivel de mRNA de hígado mediante PCR cuantitativa. Esto permitía seleccionar *a posteriori* los ratones con niveles más bajos de Mst3 y excluir de los datos obtenidos aquellos que no contaran con la mitad o menos de mRNA de Mst3 que el que presentaban los ratones WT. Se observa que los niveles de mRNA de Mst3 son significativamente menores en ratones KD ( $<0,5$ ) con respecto a ratones WT (1) (figura 35B). Los ratones KD presentan menos del 50% de proteína Mst3 que los WT (figura 35C).

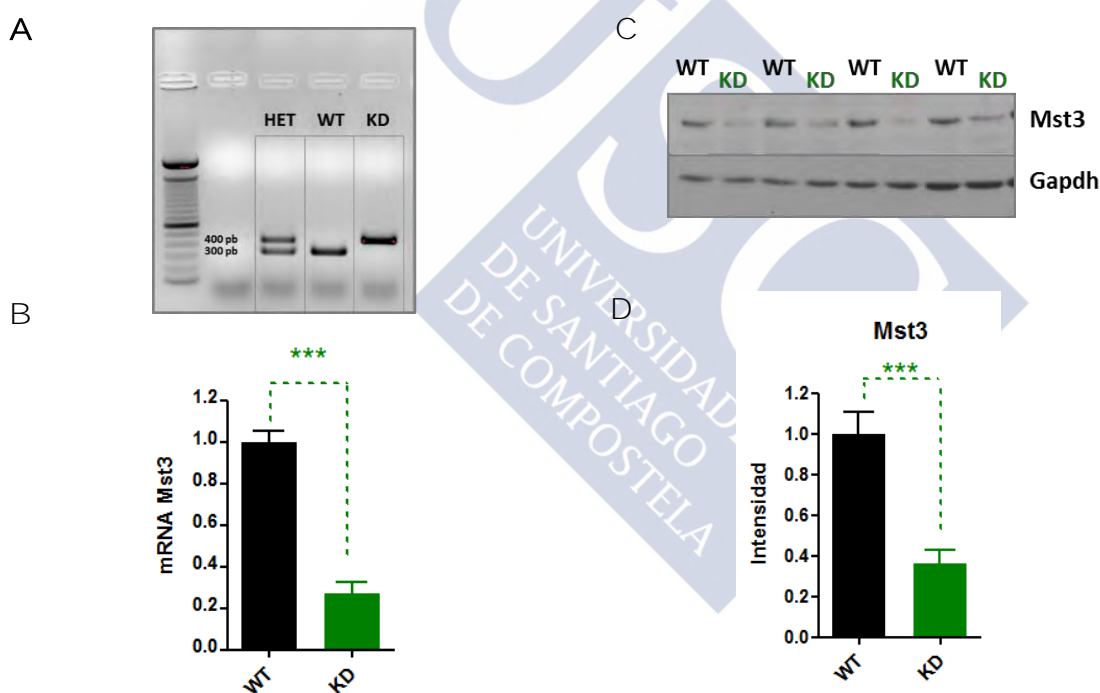


FIGURA 35. Selección de ratones KD que presenten menos del 50% de mRNA y proteína de Mst3 que los WT. A. PCR mostrando el genotipado de ratones macho WT, heterocigotos y KD para la mutación de Mst3. El genotipo WT presenta una banda a la altura de 304 pb, el KD una banda a la altura de 400 pb y el genotipo heterocigoto consta de dos bandas de ambos pesos. B. Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de Mst3 en ratones WT vs KD. Sólo se han incluido en la media los ratones deficientes para Mst3 que presentaran el 50% o menos de mRNA de Mst3 que los WT. (test t, 2 colas), (WT n=8, KD n=8  $p<0,0001$ ). C. WB para Mst3 de ratones macho WT y KD. D. Cuantificación del WB por densitometría mediante el programa Image J. (test t, 2 colas), (WT n= 8, KD n=7,  $p=0,0002$ ).

## 4. EFECTO DE LA FALTA DE Mst3 SOBRE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA EN RATONES

### 4.1. Los ratones deficientes para Mst3 de 2 meses de edad y alimentados con una dieta convencional no presentan alteraciones metabólicas.

Una vez se dispuso de un método de genotipado adecuado para detectar a aquellos ratones deficientes para Mst3 se procedió a estudiar la relevancia que la falta de Mst3 podría tener en ciertos parámetros metabólicos. Primero se quiso saber si Mst3 afectaba al fenotipo metabólico en ratones sometidos a una dieta normal a las 8 semanas de edad.

#### 4.1.1. Fenotipado metabólico

Lo primero fue determinar el peso corporal (figura 36) para el que no se observan diferencias entre WT y KD ni en machos ni en hembras, ni tampoco en las determinaciones de composición corporal, masa magra y masa grasa (figura 37) medidos usando la técnica de resonancia magnética nuclear. Se realizó además un fenotipado metabólico más amplio introduciendo a los ratones de 8 semanas y en dieta convencional en jaulas metabólicas durante 48 horas. Los parámetros medidos fueron los siguientes:

✓ **Gasto energético (EE, *Energy Expenditure*).** El gasto energético se mide en Kilocalorías/hora/kilogramo de peso del ratón y se mide en dos periodos, el de luz y el de oscuridad. EE es significativamente mayor tanto en machos como en hembras por la noche que por el día ( $p < 0,05$ ) debido a que son animales de actividad nocturna. Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas para este parámetro entre WT y KD en ninguno de los dos sexos. Se comparó también el gasto energético total (luz+oscuridad) que tampoco presentó diferencias significativas (figura 38).

✓ **Actividad locomotora (LA, *Locomotor Activity*).** La actividad locomotora se expresa como el número de veces que el paso del ratón corta los haces que atraviesan la jaula. Como es esperable, LA es significativamente mayor en oscuridad tanto en machos como en hembras  $p < 0,0001$  puesto que son animales de actividad nocturna. Sin

embargo, no se encuentran diferencias significativas en este parámetro entre WT y KD en ninguno de los dos sexos, tampoco en LA total (luz+oscuridad) (figura 39).

✓ **Cociente respiratorio (RQ, *Respiratory Quotient*).** Otro de los parámetros que recoge este tipo de jaulas es el cociente respiratorio (RQ) que se obtiene de la relación entre el volumen de CO<sub>2</sub> expulsado por los ratones y el volumen de O<sub>2</sub> consumido ( $VCO_2/VO_2$ ) y que es diferente en los periodos de luz u oscuridad. El cociente suele variar entre 0,7 y 1 en función de la fuente energética que esté usando el ratón en cada periodo (tabla 13, mat & met). Como es esperable, el RQ es significativamente mayor en oscuridad tanto en machos como en hembras ( $p < 0,0001$ ) acercándose al valor de 1 correspondiente al consumo de carbohidratos puesto que estos animales se alimentan durante la noche. No existen diferencias entre ratones WT y KD ni en machos ni en hembras con respecto a este parámetro. El RQ promedio (luz+oscuridad) no presenta diferencias significativas (figura 40).

✓ **Ingesta (FI, *food intake*).** El sistema está dotado de unas cestas dispensadoras de comida capaces de detectar la cantidad que consumen los ratones dentro de la jaula. La comparación entre WT y KD no muestra diferencias significativas en ingesta tanto en los machos como en las hembras, tanto por el día como por la noche (figura 41).

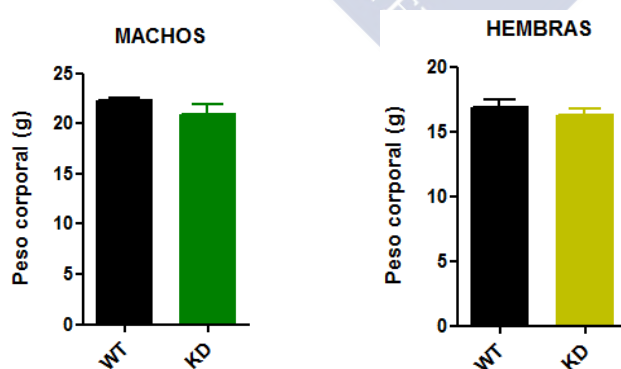


FIGURA 36. No hay variaciones en el peso de ratones Mst3 KD con respecto a los WT tanto en machos como en hembras. La medida de peso se realizó a las 8 semanas de edad. (test t, 2 colas), (MACHO WT n=8, MACHO KD n=7 p valor=0,18), (HEMBRA WT n=8, HEMBRA KD n=10 p valor= 0,47).



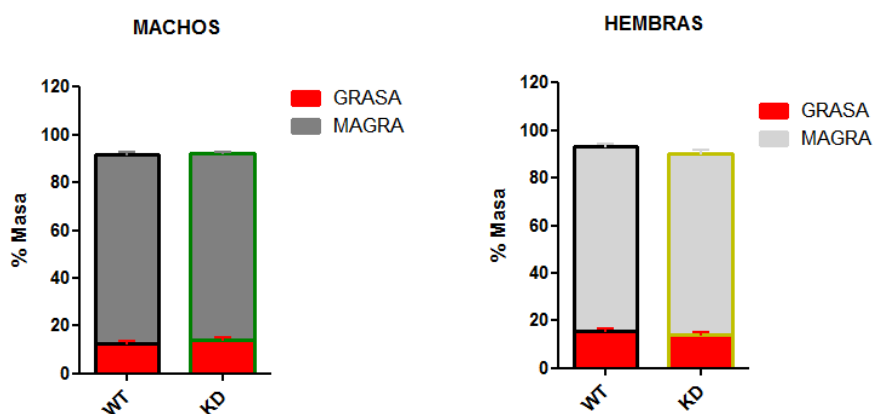


FIGURA 37. No hay variaciones en el % de masa grasa o masa no grasa (magra) de ratones Mst3 KD con respecto a los WT tanto en machos como en hembras. Los % de grasa o masa magra se obtuvieron corrigiendo los valores proporcionados por EchoMRI para cada ratón con su peso corporal total. (test t, 2 colas), (MACHO WT n=6, MACHO KD n=6 p valor % grasa=0,40 p valor % masa no grasa=0,69), (HEMBRA WT n=8, HEMBRA KD n=8 p valor % grasa= 0,22 p valor % masa no grasa=0,32).

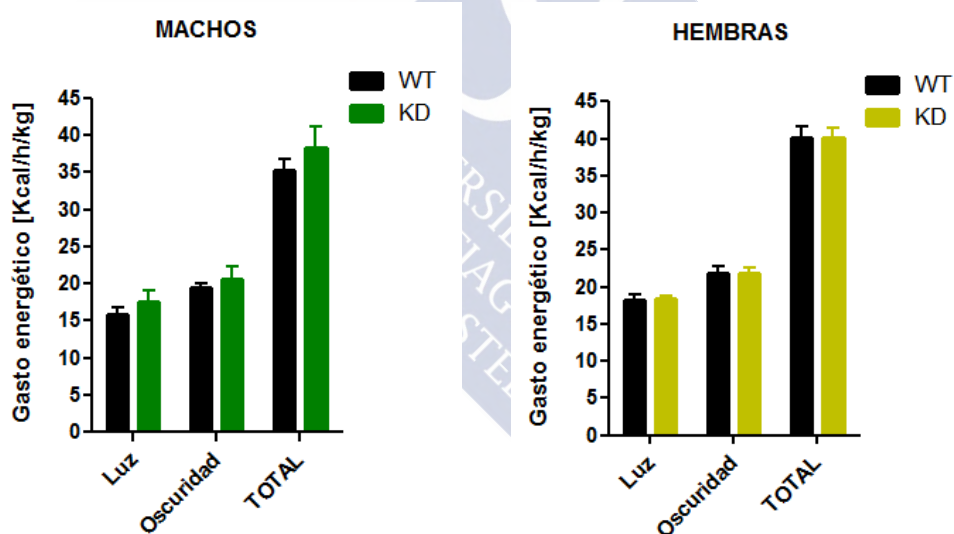


FIGURA 38. No hay variaciones en el EE de ratones Mst3 KD con respecto a los WT tanto en machos como en hembras en los periodos de luz y oscuridad ni en el EE total. (test t, 2 colas), (MACHO WT n=6, MACHO KD n=6 p valor=0,39), (HEMBRA WT n=8, HEMBRA KD n=8 p valor=0,98).

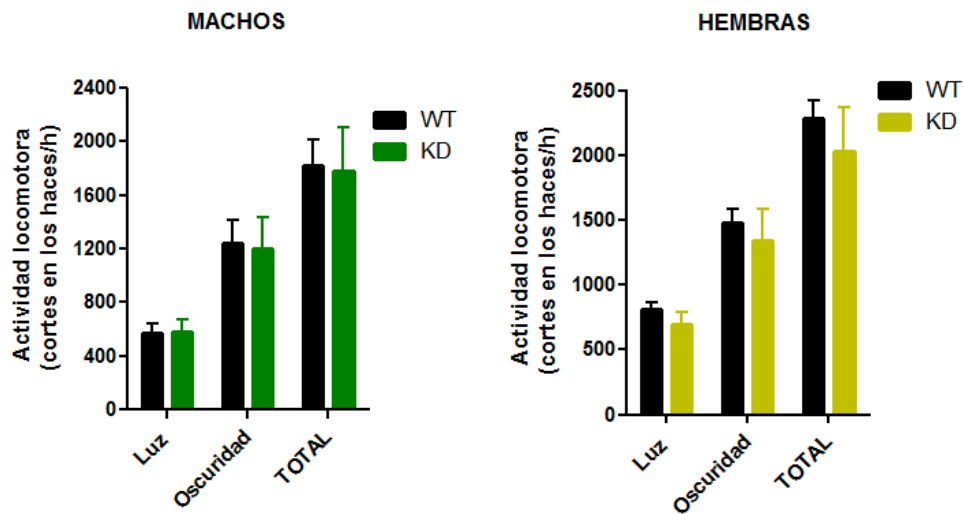


FIGURA 39. No hay variaciones en la LA de ratones Mst3 KD con respecto a los WT tanto en machos como en hembras en los periodos de luz y oscuridad ni en la LA total. (test 2 colas), (MACHO WT n=6, MACHO KD n=6 p valor=0,91), (HEMBRA WT n=8, HEMBRA KD n=8 p valor=0,51).

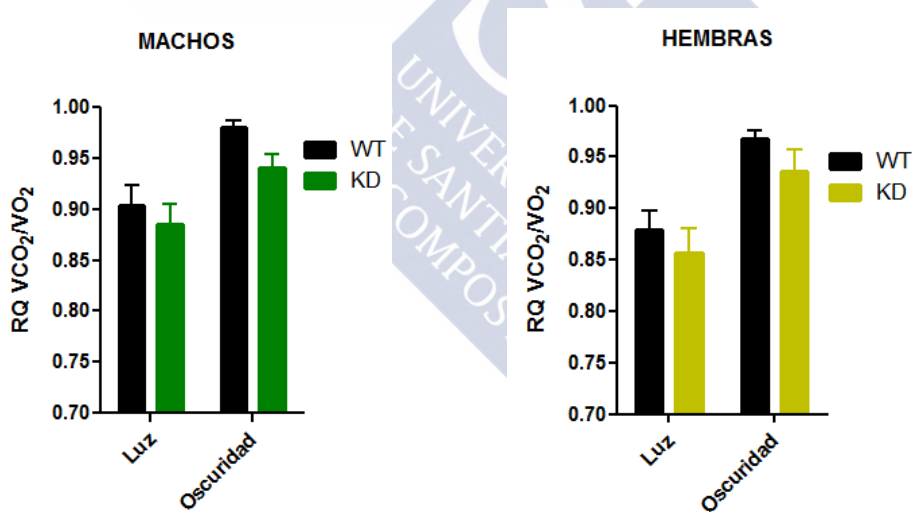


FIGURA 40. No hay variaciones en RQ de ratones Mst3 KD con respecto a los WT tanto en machos como en hembras en los periodos de luz y oscuridad. (test t, 2 colas) (MACHO WT n=6, MACHO KD n=6 p valor=0,17), (HEMBRA WT n=8, HEMBRA KD n=8 p valor=0,31).



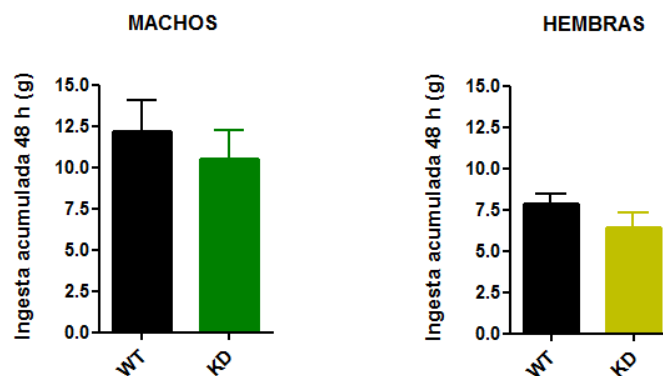


FIGURA 41. No hay variaciones en la ingesta de ratones Mst3 KD con respecto a los WT tanto en machos como en hembras. La cantidad de comida ingerida en gramos se corresponde con la acumulada durante el periodo de 48 horas que los ratones permanecen en las jaulas metabólicas tratándose de una dieta convencional. (test t, 2 colas), (MACHO WT n=6, MACHO KD n=6 p valor=0,53), (HEMBRA WT n=8, HEMBRA KD n=8 p valor=0,21).

#### 4.1.2. Homeostasis de la glucosa

Aunque no se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los parámetros del fenotipado metabólico entre WT y KD de Mst3 se quiso ver más específicamente en estos ratones de 8 semanas en dieta convencional el efecto de la falta de Mst3 sobre el metabolismo de la glucosa. Lo primero fue tomar medidas de las glucosas basales tomadas tras un periodo de ayuno nocturno. No se encuentran diferencias entre ratones WT y KD. (figura 42). Seguidamente se llevaron a cabo los tests de tolerancia comunes: un test de tolerancia a la glucosa (GTT) y un test de tolerancia a insulina (ITT). Ninguno de los dos test realizados en ratones de estas condiciones mostró diferencias significativas ni en machos ni en hembras, tampoco sus áreas bajo la curva (AUC) (figuras 43, 44). Como ninguno de los test comunes proporcionaba diferencias significativas, se realizó un nuevo test más específico, el test de tolerancia a piruvato (PTT), para valorar la capacidad de producir glucosa a partir de un precursor gluconeogénico como es el piruvato. Estos tests se realizaron tras un periodo de ayuno nocturno (14 horas aproximadamente), periodo tras el cual se habrían agotado prácticamente todas las reservas de glucógeno del ratón, por tanto, la glucosa en sangre ha de restablecerse en base al aporte de otras fuentes como la gluconeogénesis. Puesto que habíamos visto en células HepG2 que la falta de Mst3 afectaba a la regulación de las enzimas gluconeogénicas PCK1 y G6PC se esperaba que los ratones KD

para Mst3 no fuesen capaces de producir glucosa a los niveles que lo harían los WT en el test de tolerancia a piruvato (PTT). Sin embargo, se encontró que el aumento de glucemia era también independiente de los niveles de Mst3 en estas condiciones tanto en machos como en hembras y tampoco las AUC fueron distintas (figura 45).

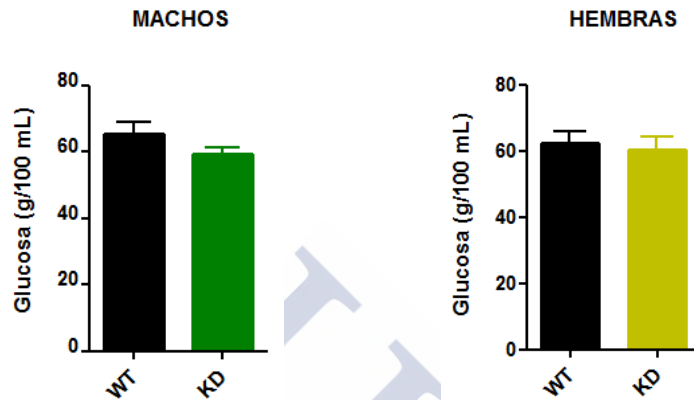
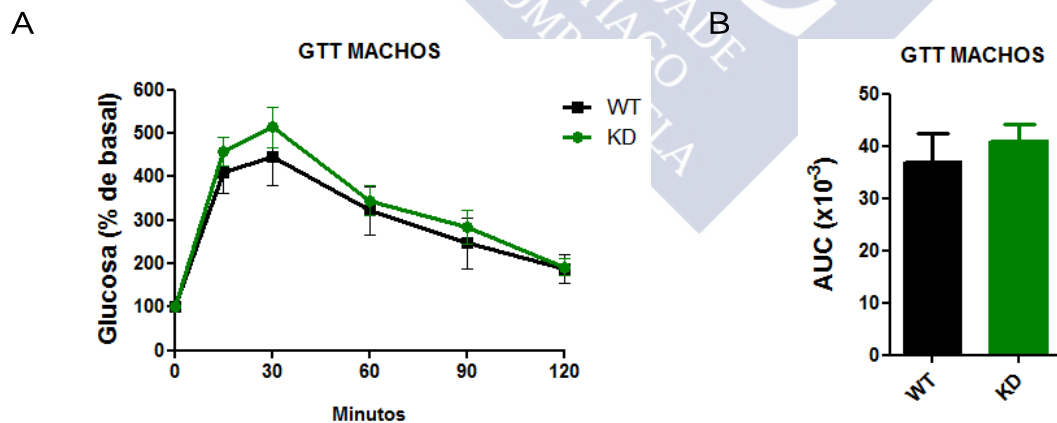


FIGURA 42. La glucosa basal de ratones KD para Mst3 no muestra diferencias significativas con respecto a los WT. Se mantuvieron los ratones en ayunas durante 14 horas, transcurrido este periodo se les midió la glucosa sanguínea (mg/dL). (test t, 2 colas) (MACHO WT n=14, MACHO KD n=13 p valor=0,19), (HEMBRA WT n=15, HEMBRA KD n=15 p valor=0,7).



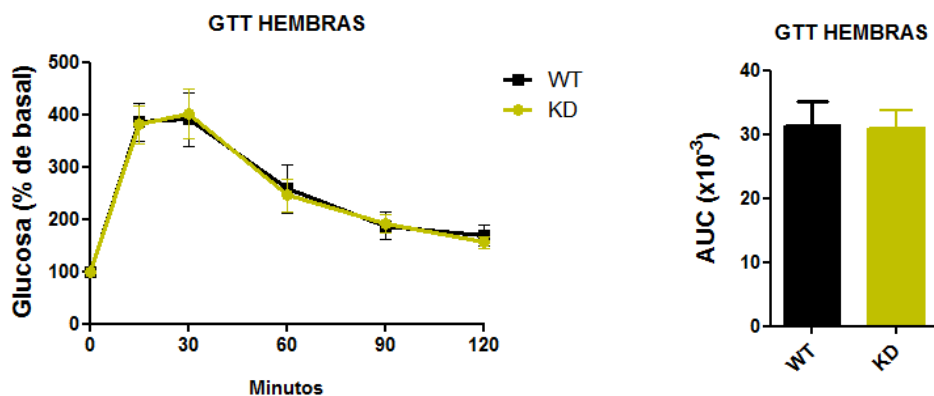


FIGURA 43. A. El GTT no presenta diferencias significativas entre WT y KD tanto en machos como en hembras. Se mantuvieron los ratones en ayunas durante 14 horas, transcurrido este periodo se inyectaron intraperitonealmente con D-glucosa a una dosis 2g/kg peso corporal y se les midió la glucosa sanguínea (mg/dL) en intervalos de 30' durante 2h. Se muestran los valores de glucosa en cada punto en % relativo a los valores de glucosa basal. B. Áreas bajo la curva (AUC). (test t, 2 colas), (MACHO WT n=8, MACHO KD n=7 p valor=0,56), (HEMBRA WT n=9, HEMBRA KD n=10 p valor=0,95).

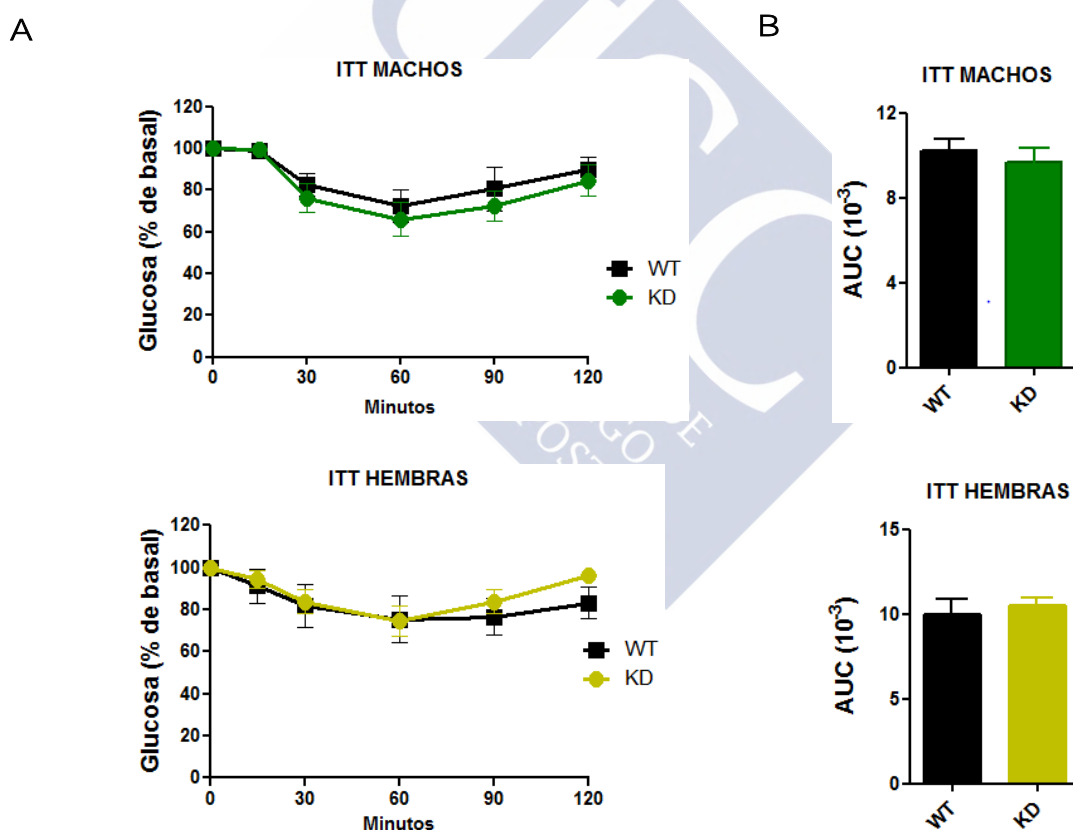


FIGURA 44. A. El ITT no presenta diferencias significativas entre ambos genotipos tanto en machos como en hembras. Se mantuvieron los ratones en ayunas durante 14 horas, transcurrido este periodo se inyectaron intraperitonealmente con insulina a una dosis de 0,75U/kg de peso corporal y se les midió la glucosa sanguínea (mg/dL) en intervalos de 15' o 30' durante 2h. Se muestran los valores de glucosa en cada punto en % relativo a los valores de glucosa basal. B. Áreas bajo la curva (AUC). (test t, 2 colas), (MACHO WT n=6, MACHO KD n=7 p valor=0,55), (HEMBRA WT n=6, HEMBRA KD n=8 p valor=0,59).

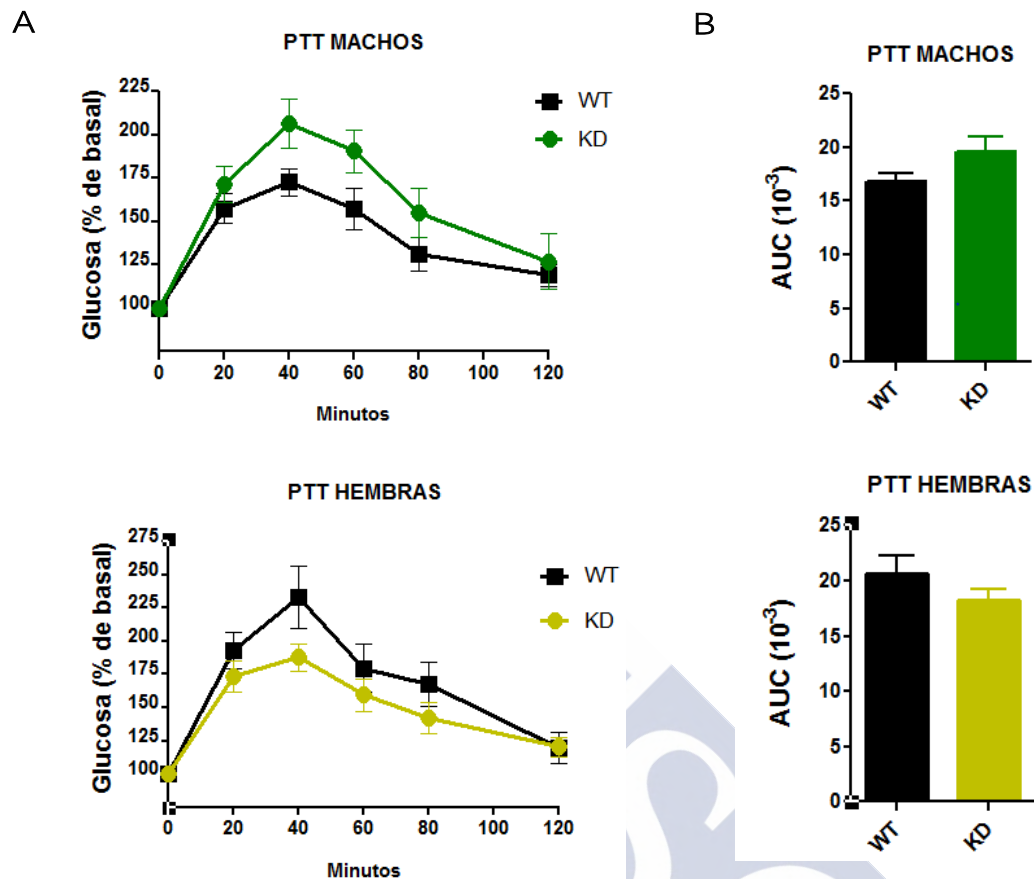


FIGURA 45. A. El PTT no presenta diferencias significativas entre ambos genotipos tanto en machos como en hembras. Se mantuvieron los ratones en ayunas durante 14 horas, transcurrido este periodo se inyectaron intraperitonealmente con piruvato a una dosis de 1,25g/kg peso corporal y se les midió la glucosa sanguínea (mg/dL) en intervalos de 20' durante 2h. Se muestran los valores de glucosa en cada punto en % relativo a los valores de glucosa basal. B. Áreas bajo la curva (AUC). (test t, 2 colas), (MACHO WT n=8, MACHO KD n=9 p valor=0,12), (HEMBRA WT n=9, HEMBRA KD n=10 p valor=0,23).

#### 4.1.3. Expresión de genes gluconeogénicos

Los estudios *in vivo* no mostraron efectos ante la falta de Mst3 en metabolismo de ratones modificados genéticamente alimentados con dieta convencional durante 8 semanas. No obstante, estos ratones fueron sacrificados y se extrajo mRNA de sus hígados para ver cómo estaba la expresión de los genes gluconeogénicos *Pck1* y *G6pc*. También se analizaron genes de respuesta a ayuno como son *Slc1a2*, *Aldh3a2*, *St3gal5* según lo descrito por (Boj, van Es et al. 2012) y (Sanderson, Degenhardt et al. 2009). Ninguno de los genes analizados mostraba diferencias en su expresión en hígado ante la falta de Mst3 (figura 46).

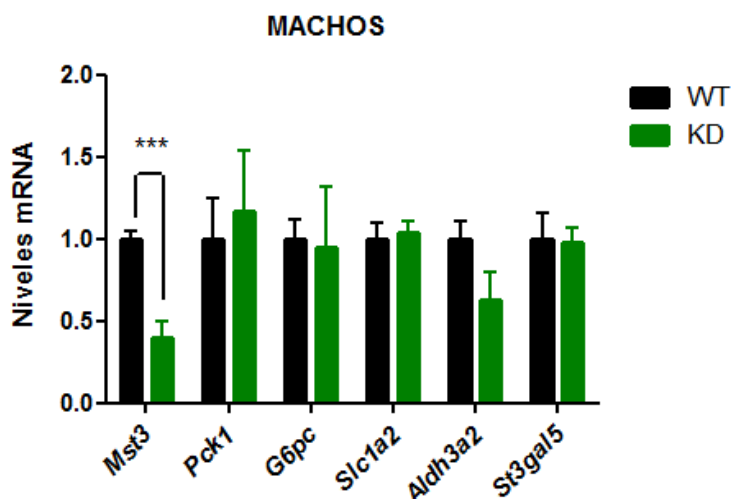


FIGURA 46. No hay variaciones en los niveles de expresión de genes gluconeogénicos y de respuesta al ayuno. El mRNA se extrajo de hígados de ratones sometidos a un ayuno nocturno de **14 horas y sacrificados 20'** después de la inyección intraperitoneal del precursor gluconeogénico piruvato para inducir la expresión de genes gluconeogénicos. Se analizaron dichos genes gluconeogénicos mediante qPCR incluyendo los genes control o housekeeping *Actb* y *Rplp0*. (ANOVA, 2 colas con corrección de Bonferroni). Se muestran también los niveles de mRNA de *Mst3*. Sólo se incluyeron en la estadística aquellos ratones KD con menos del 50% de *Mst3* que los WT. (p valor *Mst3*=0,00078).

#### 4.2. La dieta alta en grasa (**HFD**) desencadena la activación de las quinasas GCK-III

Como se describe en la introducción, las quinasas Msts tienen diversas funciones y se conoce ampliamente su activación en condiciones de estrés oxidativo. Conociendo también la implicación de una de ellas (STK25/SOK1) en el metabolismo de la glucosa de ratones alimentados con una dieta alta en grasa (Nerstedt, Cansby et al. 2012, Cansby, Amrutkar et al. 2013, Amrutkar, Cansby et al. 2015, Amrutkar, Kern et al. 2015) se quiso saber si estas quinasas podrían ser activadas mediante su fosforilación tras inducir a los ratones un estrés metabólico como el que supone la administración de una dieta alta en grasa (**HFD, High Fat Diet**) durante un cierto periodo de tiempo. Así, comprobamos como se puede ver en el *Western Blot* de la figura 47A que efectivamente la fosforilación de las quinasas Mst3 y SOK1 es mayor en ratones WT HFD con respecto a ratones WT alimentados con una dieta convencional (**ND, Normal Diet**). Se incluyó un control positivo de fosforilación de Mst4 de células HepG2 tratadas con Caliculina A (inhibidor de la Ser-/Thr-fosfatasa 1/2A) (Fuller, McGuffin et al. 2012). La cuantificación por densitometría confirma que pSOK1 y pMst3

están significativamente aumentadas en ratones HFD, mientras que en Mst4 no se observan cambios (figura 47B).

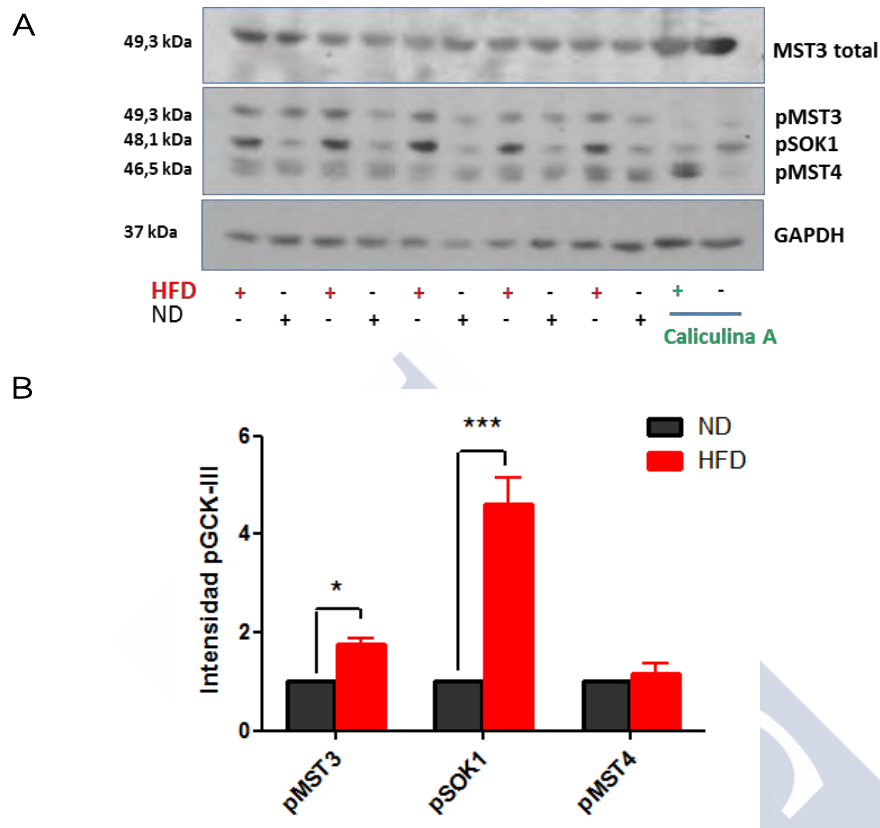


FIGURA 47. Las quinasas SOK1 y MST3 se encuentran significativamente más fosforiladas en hígados de ratones alimentados con HFD que los alimentados con dieta ND. A. WB de extractos de hígado de ratón con un anticuerpo que reconoce a las proteínas GCK-III fosforiladas en los residuos Thr178 de MST4, Thr190 de MST3 y Thr174 de SOK1. Estas proteínas tienen pesos moleculares muy próximos por lo que se hizo un gel al 6% de acrilamida y se dejaron migrar hasta conseguir la separación óptima para poder distinguirlas. Como controles de carga se utilizaron GAPDH y la proteína total Mst3 lo que además ayudó a diferenciar por peso molecular las tres proteínas fosforiladas. Se incluye un control positivo de fosforilación de Mst4 en células HepG2 tratadas durante 10 minutos con Caliculina A 100 nM. B. Cuantificación de los niveles de fosforilación de las GCK-III. La cuantificación se realizó por densitometría usando el programa Image J. (test t 2 colas, HFD n=5, ND n=5 p valor pMST3=0,01, p valor pSOK1=0,0002, p valor pMST4=0,93).

#### 4.3. Los ratones KD para Mst3 alimentados con una dieta HFD están protegidos de la hiperglucemia en ayunas y la resistencia a insulina

Una vez se comprobó que alimentando a ratones con una dieta alta en grasa se producía una mayor activación de Mst3 por fosforilación y que podría tratarse de una quinasa

importante en la respuesta a estrés metabólico, se quiso estudiar los efectos de Mst3 en estas condiciones. De esta manera se repitieron los experimentos realizados anteriormente para ratones alimentados con dieta convencional. Ratones de la misma edad, machos y hembras, tanto WT como aquellos que presentan la mitad o menos de Mst3 que estos fueron alimentados con dieta alta en grasa (45% contenido graso) durante 21 semanas. Posteriormente se sometieron a un fenotipado metabólico como el realizado a las 8 semanas de edad y alimentados con dieta convencional.

#### 4.3.1. Evolución del peso corporal durante 21 semanas de HFD

Durante este periodo se hizo un seguimiento del peso corporal, se calculó la ganancia en gramos desde la semana previa al inicio de la HFD sin encontrar diferencias significativas en WT y KD en ningún caso, aunque con cierta tendencia a que el peso sea menor en los KD (figura 48). Se observa que la ganancia de peso en el caso de las hembras es menor que en los machos, prácticamente la mitad (mientras los machos adquirieron unos 20 gramos, las hembras incrementaron únicamente 10 gramos de peso) apuntando a una cierta resistencia por parte de éstas a la dieta HFD.

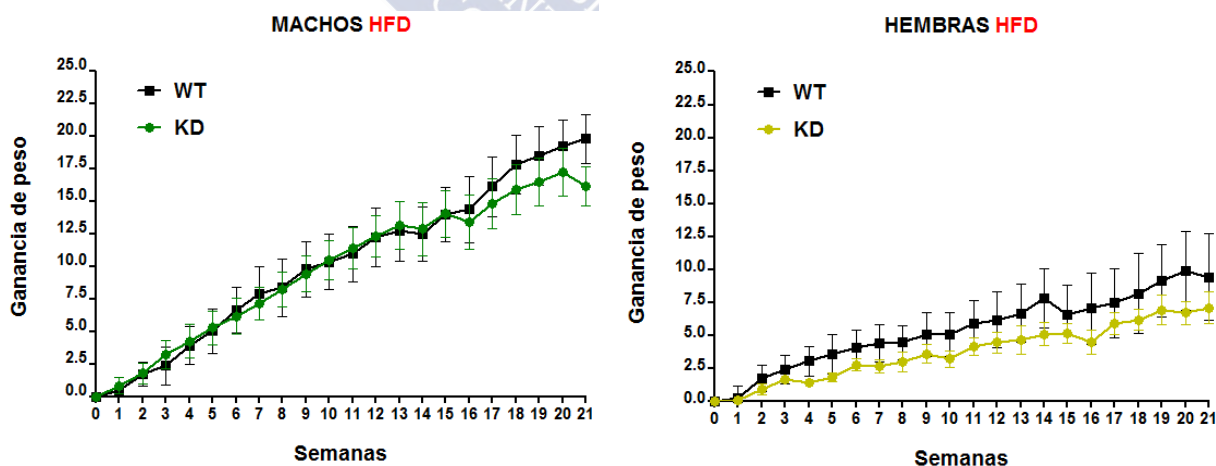


FIGURA 48. No hay variaciones en la ganancia total de peso de ratones WT y KD Mst3 alimentados con HFD 45%, tanto en machos como en hembras. A las 12 semanas de edad se les cambia la dieta convencional a los ratones anteriormente estudiados por una dieta HFD 45% durante 21 semanas y se anotan semanalmente los valores de peso corporal. (test t, 2 colas) (MACHO WT n=8, MACHO KD n=9 p valor=0,14), (HEMBRA WT n=8, HEMBRA KD n=10 p valor=0,48).



#### 4.3.2. Fenotipado metabólico después de HFD

Lo primero fue determinar el peso corporal tras el periodo de 21 semanas de HFD para el que no se observan diferencias significativas entre KD y WT (figura 49), aunque parece haber tendencia hacia un menor peso de los ratones KD Mst3 tanto en machos como en hembras. Tampoco existen diferencias en la composición corporal, masa magra y masa grasa (figura 50) medidos usando la técnica de resonancia magnética nuclear. Se realizó nuevamente un fenotipado metabólico más amplio introduciendo a los ratones alimentados durante 21 semanas con HFD en jaulas metabólicas durante 48 horas. Los parámetros medidos fueron los definidos anteriormente: gasto energético (figura 51), actividad locomotora (figura 52), cociente respiratorio (figura 53). No se encontraron diferencias significativas para ninguno de ellos entre WT y KD en ninguno de los dos sexos. Aunque el cociente respiratorio (RQ) en los periodos de luz y oscuridad por separado no presenta diferencias significativas, existe una tendencia a que este sea menor en ratones KD Mst3 que en los WT después de haber sido alimentados con dieta alta en grasa (p valor machos > 0,3, ANOVA 2 colas). Como es de esperar tras alimentar a los ratones con HFD esos tienden a usar como fuente de energía principal los lípidos y sus RQ están más alejados del valor 1 (figura 53). En cuanto a la ingesta de ratones macho alimentados con HFD existen diferencias significativas presentando menor ingesta los ratones KD (figura 54). Esto podría ir en consonancia con la tendencia a que ganen menor peso aunque sea sin significación estadística.

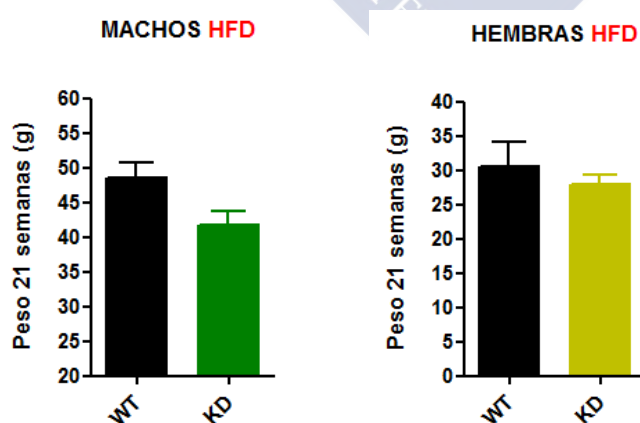
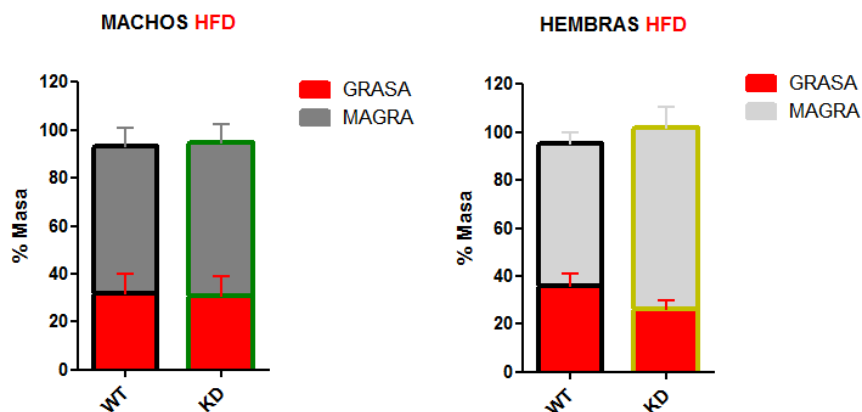
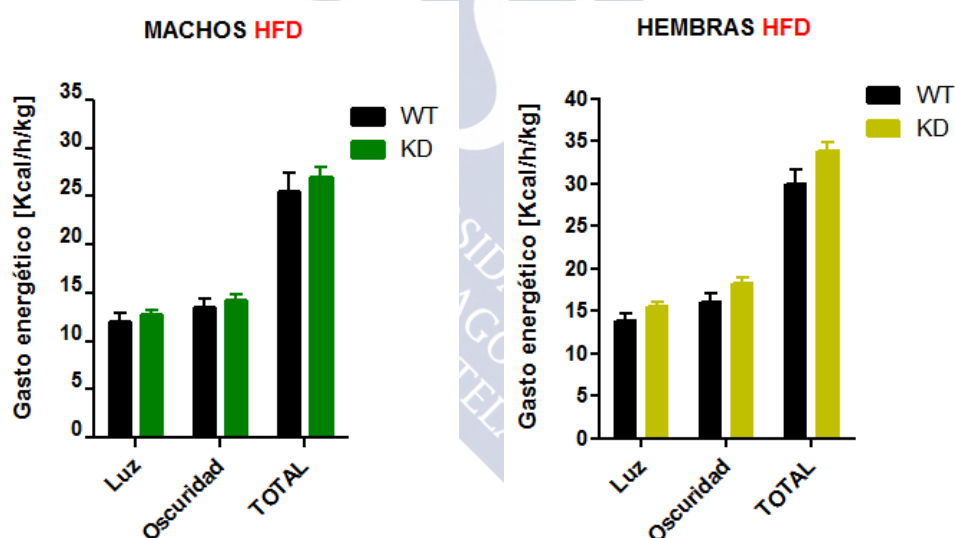


FIGURA 49. No hay variaciones en el peso de ratones HFD Mst3 KD con respecto a los WT tanto en machos como en hembras. La medida de peso se realizó tras un periodo de 21 días en dieta alta en grasa. (test t, 2 colas) (MACHO WT n=8, MACHO KD n=9 p valor=0,07), (HEMBRA WT n=8, HEMBRA KD n=10 p valor =0,48).



**FIGURA 50.** No hay variaciones en el % de masa grasa o masa no grasa (magra) de ratones HFD Mst3 KD con respecto a los WT tanto en machos como en hembras. Los % de grasa o masa magra se obtuvieron corrigiendo los valores proporcionados por EchoMRI para cada ratón con su peso corporal total. (test t, 2 colas), (MACHO WT n=8, MACHO KD n=9 p valor % grasa=0,85 p valor % masa no grasa=0,56), (HEMBRA WT n=6, HEMBRA KD n=6 p valor % grasa= 0,14 p valor % masa no grasa=0,14).



**FIGURA 51.** No hay variaciones en EE de ratones HFD Mst3 KD con respecto a los WT tanto en machos como en hembras ni en los periodos de luz y oscuridad ni en el EE total. (test t, 2 colas), (MACHO WT n=8, MACHO KD n=9 p valor=0,45), (HEMBRA WT n=6, HEMBRA KD n=6 p valor=0,07).

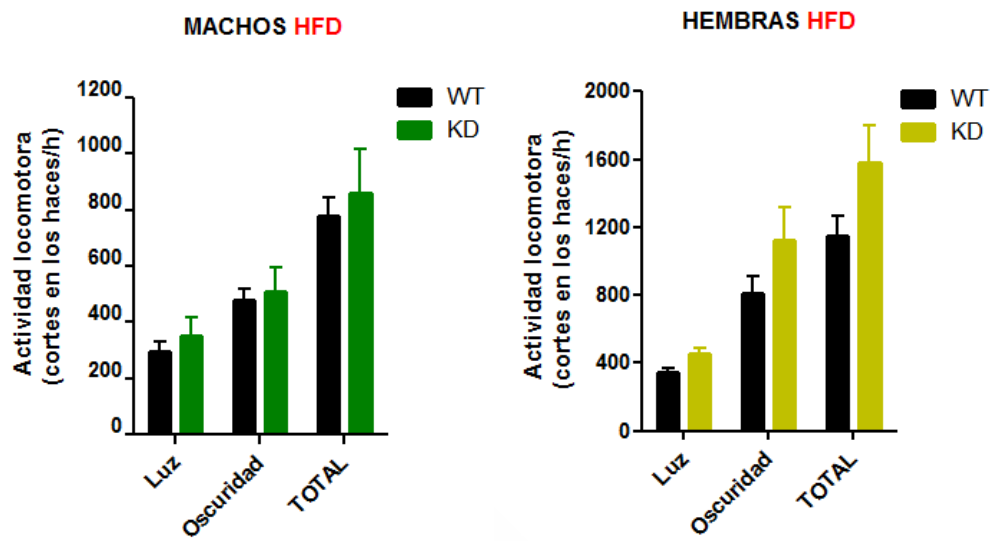


FIGURA 52. No hay variaciones en la LA de ratones HFD Mst3 KD con respecto a los WT tanto en machos como en hembras en los dos periodos de luz y oscuridad ni en la LA total. (test 2 colas), (MACHO WT n=8, MACHO KD n=9 p valor=0,64), (HEMBRA WT n=6, HEMBRA KD n=6 p valor=0,12).

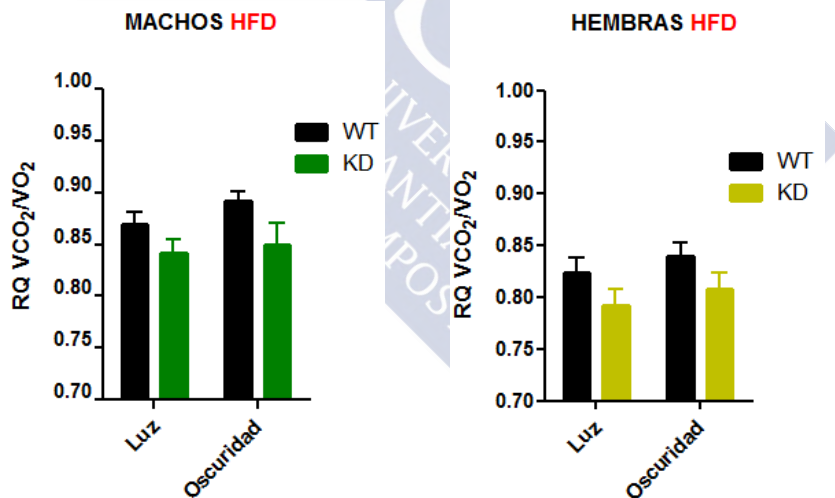


FIGURA 53. No hay variaciones en el coeficiente respiratorio (RQ) de ratones HFD Mst3 KD con respecto a los WT tanto en machos como en hembras en los periodos de luz u oscuridad. (test t, 2 colas), (MACHO WT n=8, MACHO KD n=9 p valor=0,097), (HEMBRA WT n=6, HEMBRA KD n=6 p valor=0,16).

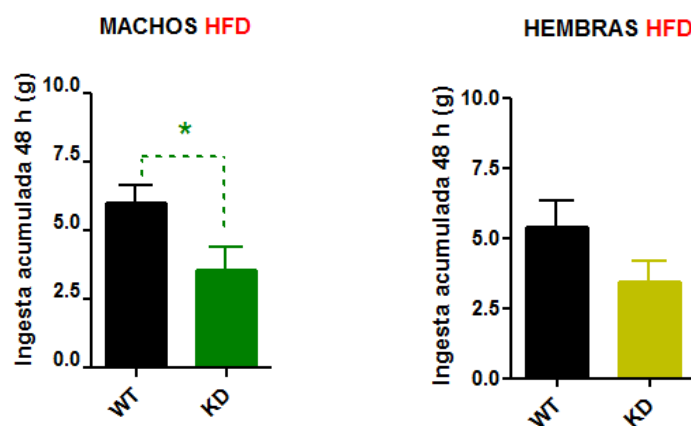


FIGURA 54. Los ratones HFD macho Mst3 KD presentan menor ingesta que los WT. La cantidad de comida ingerida en gramos se corresponde con la acumulada durante el periodo de 48 horas en que los ratones permanecen en las jaulas metabólicas tratándose de una dieta convencional. (test t, 2 colas), (MACHO WT n=8, MACHO KD n=9 p valor=0,04), (HEMBRA WT n=6, HEMBRA KD n=6 p valor=0,14).

#### 4.3.3. Homeostasis de la glucosa después de HFD

Después de un periodo de 21 semanas con dieta alta en grasa, tampoco se encontraron diferencias relevantes durante el fenotipado metabólico. Teniendo en cuenta que Mst3 se activa por fosforilación tras la HFD, se quiso analizar concretamente el efecto de la falta de Mst3 sobre el metabolismo de la glucosa para lo cual se les realizaron a los animales obesos los test de tolerancia comunes a glucosa e insulina GTT e ITT respectivamente. Como estos test se realizan típicamente tras un periodo de ayuno nocturno (14 horas aproximadamente) se compararon las glucosas basales tomadas justo antes de la realización de los test y como se puede ver en la figura 55, encontramos diferencias entre ratones macho WT y ratones macho KD que tienen menores glucosas basales. Sin embargo esto no sucede en las hembras.

Debido a la diferencia encontrada para los machos, se quisieron comparar los niveles de glucosa con los de los mismos ratones antes de ser sometidos a la dieta alta en grasa. Tras 21 semanas de dieta alta en grasa la glucosa basal de los ratones macho WT ha aumentado de forma significativa con respecto a la glucosa basal que presentaban cuando permanecieron durante 8 semanas con una dieta convencional, indicando que la dieta HFD ha sido efectiva. Sin embargo, en el caso de los ratones macho KD para Mst3, el aumento no es significativo. Esto parece indicar que los ratones macho KD presentaron cierta resistencia a aumentar su glucosa basal en ayunas tras ser alimentados con dieta alta en grasa 45%. Del

mismo modo, la situación pareciera repetirse en las hembras, puesto que el aumento de glucosa basal en WT es de 9 g/100 mL mientras que en las deficientes para Mst3 este aumento es sólo de 4 g/100 mL, aunque en ninguno de los casos el aumento es significativo (figura 56). Esto a su vez sugiere una mayor resistencia al desarrollo de hiperglucemia en hembras normales que en machos normales. Se realizaron estas mismas comprobaciones a las 15 semanas de HFD (no se muestran datos), pero la glucosa basal no había aumentado con respecto a la glucosa basal que presentaban a las 8 semanas en dieta convencional y fue necesario continuar con la dieta alta en grasa hasta las 21 semanas.

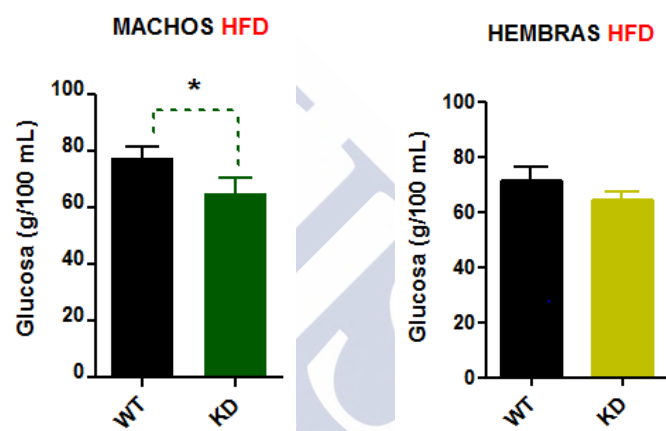


FIGURA 55. La glucosa basal de ratones macho HFD KD para Mst3 es significativamente menor que en los WT. Se mantuvieron los ratones en ayunas durante 14 horas, transcurrido este periodo se les midió la glucosa sanguínea (mg/dL) con un glucómetro. (test t, 2 colas) (MACHO WT n=8, MACHO KD n=9 p valor=0,014), (HEMBRA WT n=8, HEMBRA KD n=10 p valor=0,1).

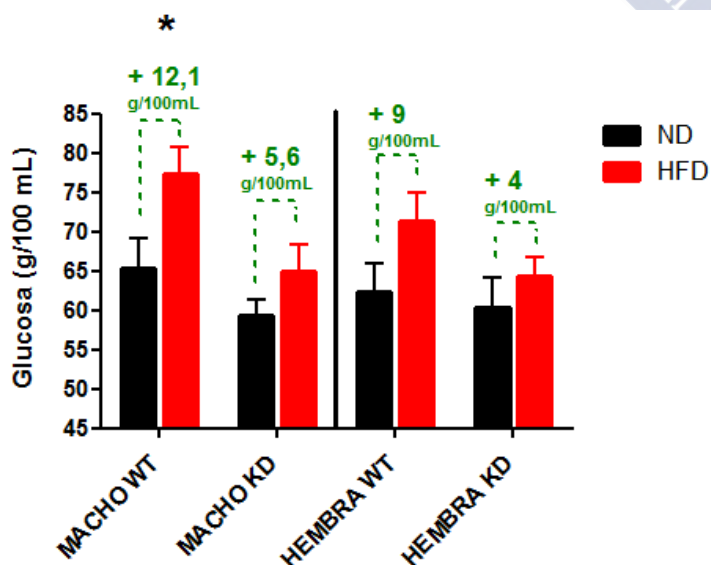


FIGURA 56. Los ratones KD Mst3 presentan resistencia a la dieta alta en grasa. Se comparan las glucosas basales en g/100 mL tras ayuno de 14 horas de los ratones WT y KD Mst3 en dieta convencional durante 12 semanas con respecto a las glucosas basales de los ratones WT y Mst3 KD alimentados durante 21 semanas con HFD. (test t, 2 colas) (MACHO WT n=8 p valor=0,03, MACHO KD n=9 p valor=0,29), (HEMBRA WT n=8 p valor=0,1, HEMBRA KD n=10 p valor=0,37).

A continuación se muestran los test de tolerancia a glucosa GTT e insulina ITT. En el caso del GTT no se encuentran diferencias significativas entre WT y KD ni en machos ni en hembras incluso después de ser alimentados con HFD por lo que la falta de Mst3 no suponía un problema en el manejo de glucosa cuando se administra intraperitonealmente (figura 57). En el caso del ITT de ratones alimentados con HFD encontramos por primera vez diferencias significativas en los machos KD Mst3 con respecto a los WT. Como es esperable, tras la administración de una dieta alta en grasa, los ratones WT aumentan su glucosa basal y presentan cierta resistencia a insulina. Por el contrario, los ratones KD Mst3 presentan una glucosa basal más baja y además responden mejor a la administración de insulina intraperitoneal reduciendo en mayor medida sus niveles de glucosa sanguínea. Las diferencias significativas se manifiestan como una menor glucosa de los machos KD tras la administración de insulina intraperitoneal en dos de los tiempos de medida y en la AUC. Esto no ocurre para las hembras (figura 58).

En un estado de resistencia a insulina propiciado por la administración de una dieta alta en grasa en el que también los niveles de glucosa basal después de ayuno están aumentados, la gluconeogénesis contribuiría todavía más a aumentar dichos niveles. Por ello, y teniendo en cuenta la posible regulación de Mst3 sobre enzimas gluconeogénicas, resultaba interesante comparar nuevamente la capacidad que presentaban estos ratones obesos para transformar piruvato a glucosa en un test más específico, PTT o test de tolerancia a piruvato, en ausencia o presencia de Mst3. Como se puede ver en la figura 59, los ratones deficientes para Mst3 presentan niveles significativamente menores de glucosa sanguínea tras la administración intraperitoneal de su precursor piruvato que animales WT, tanto en dos de los tiempos de medida como en la AUC. Esto no ocurre de la misma forma para las hembras, que no presentan diferencias significativas.

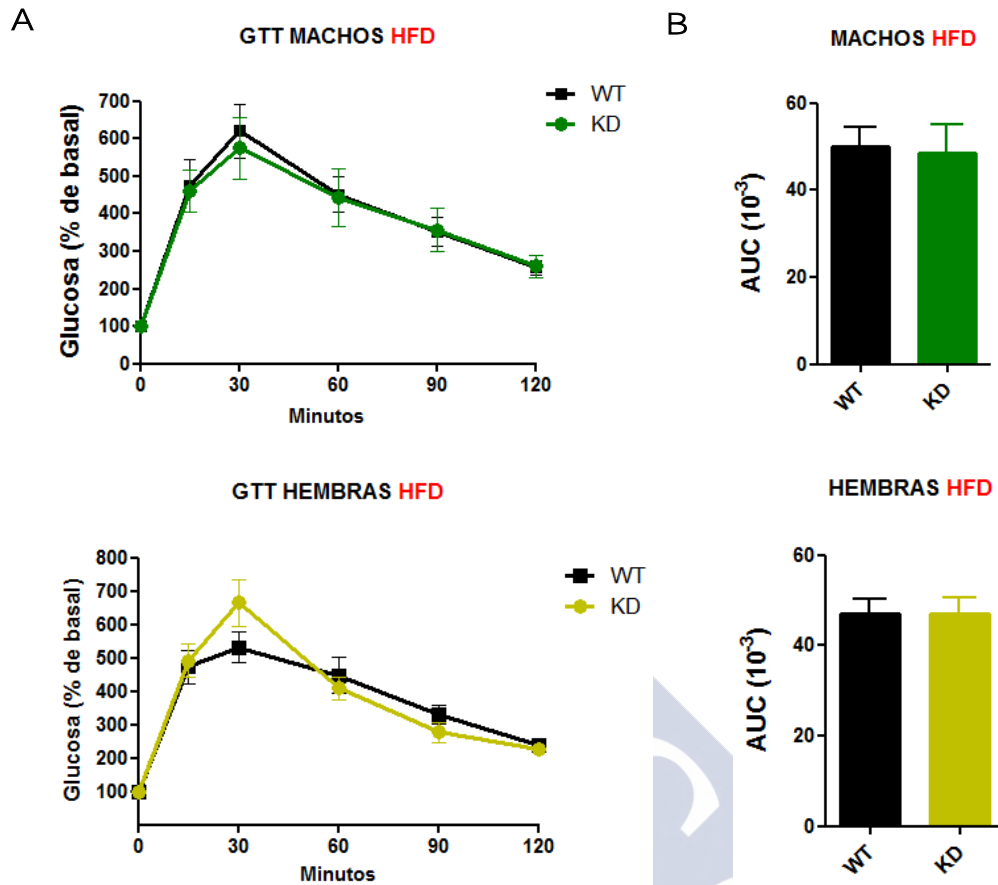


FIGURA 57. A. El GTT no presenta diferencias significativas entre ambos genotipos alimentados con HFD tanto en machos como en hembras. Se mantuvieron los ratones en ayunas durante 14 horas, transcurrido este periodo se inyectaron intraperitonealmente con D-glucosa a una dosis 2g/kg peso corporal y se les midió la glucosa sanguínea (mg/dL) en intervalos de 30' durante 2h. Se muestran los valores de glucosa en cada punto en % relativo a los valores de glucosa basal. B. Áreas bajo la curva (AUC). (test t, 2 colas) (MACHO WT n=9, MACHO KD n=9 p valor=0,88), (HEMBRA WT n=8, HEMBRA KD n=9 p valor=0,95).



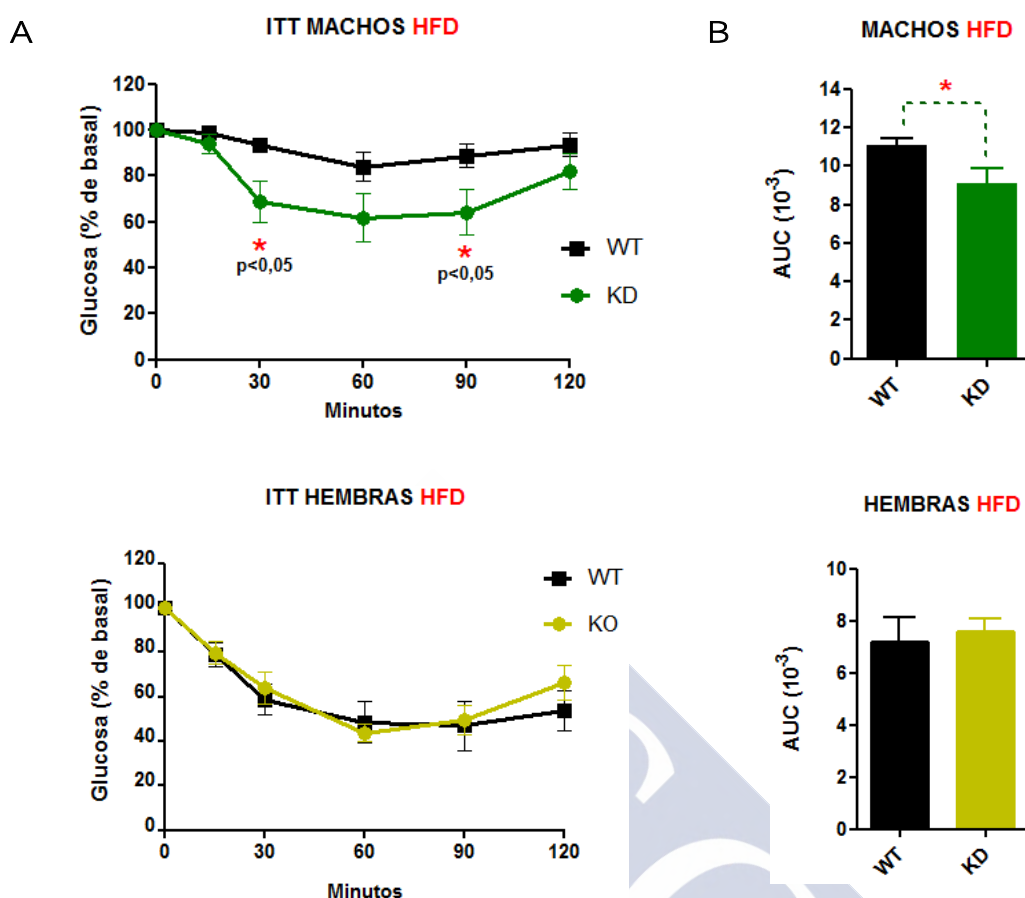


FIGURA 58.A. Los ratones machos HFD KD Mst3 responden mejor a insulina que los machos HFD WT. Se mantuvieron los ratones en ayunas durante 14 horas, transcurrido este periodo se inyectaron intraperitonealmente con insulina a una dosis de 0,75U/kg de peso corporal y se les midió la glucosa sanguínea (mg/dL) en intervalos de 15' o 30' durante 2h. Se muestran los valores de glucosa en cada punto en % relativo a los valores de glucosa basal. B. Áreas bajo la curva (AUC). (test t, 2 colas), (MACHO WT n=9, MACHO KD n=9 p valor=0,038), (HEMBRA WT n=8, HEMBRA KD n=10 p valor=0,72).

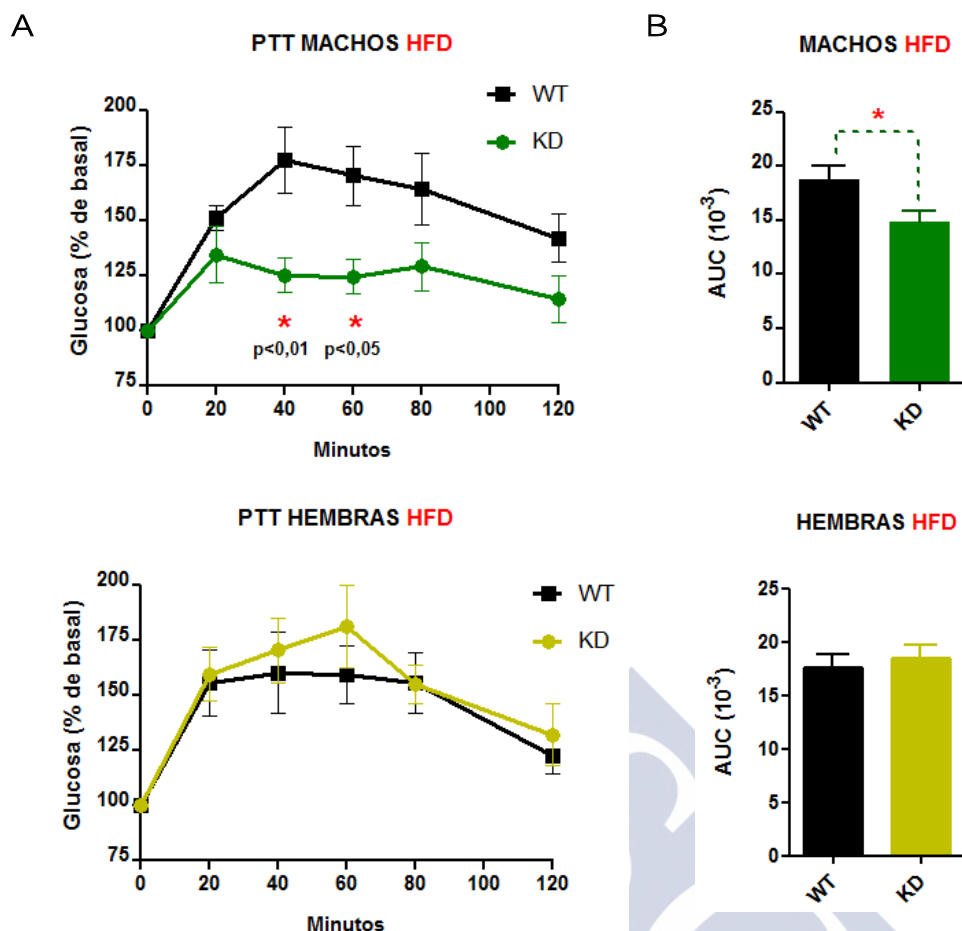


FIGURA 59. A. Los ratones machos HFD KD Mst3 producen menos glucosa a partir de piruvato que los WT. Se mantuvieron los ratones en ayunas durante 14 horas, transcurrido este periodo se inyectaron intraperitonealmente con piruvato a una dosis de 1,25g/kg peso corporal y se les midió la glucosa sanguínea (mg/dL) en intervalos de 20' durante 2h. Se muestran los valores de glucosa en cada punto en % relativo a los valores de glucosa basal. B. Áreas bajo la curva (AUC). (test t, 2 colas), (MACHO WT n=9, MACHO KD n=9 p valor=0,026), (HEMBRA WT n=8, HEMBRA KD n=10 p valor=0,61).

#### 4.3.4. Niveles de insulina en suero

Dado que el test de tolerancia a insulina mostró diferencias significativas para los machos indicando que los KD Mst3 respondían mejor a la inyección intraperitoneal de insulina disminuyendo sus niveles de glucosa en mayor medida que los WT, nos planteamos mirar directamente los niveles de esta hormona en suero tras 3 horas de ayunas. La figura 60A nos muestra niveles significativamente inferiores de insulina en suero para los ratones Mst3 KD con respecto a los WT después de ser alimentados con HFD. Las diferencias no parecen tan relevantes en ND lo que apoya los resultados mostrados hasta ahora en cuanto

al papel de Mst3 activado por estrés metabólico y concuerdan con el hecho de que los ratones deficientes en Mst3 presenten cierta resistencia a sufrir los efectos de la dieta alta en grasa y por tanto que se conviertan en menos resistentes a insulina. De hecho, el incremento en insulina debido a la administración de HFD y como indicador de resistencia a insulina, es sólo significativo para los WT.

Los bajos niveles de insulina en ratones Mst3 KD con respecto a los WT tras la HFD junto con el hecho de que sus glucosas basales en ayuno también sean significativamente menores (figura 56), nos está indicando que la falta de Mst3 podría mejorar la sensibilidad a insulina en un estado similar a la diabetes inducida por obesidad. En ese sentido nos pareció interesante aplicar a nuestros ratones el índice HOMA-IR (Matthews, Hosker et al. 1985). HOMA-IR son las siglas en inglés del modelo homeostático de evaluación de la resistencia a insulina. Es un cálculo derivado de la glucosa en ayunas y la insulina en ayunas y su utilidad consiste en evaluar la presencia de resistencia a la insulina, condición que es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares y enfermedades tales como el síndrome metabólico y la diabetes mellitus. Se calcula según la fórmula mostrada más abajo en base a una constante diseñada para humanos pero el resultado se puede trasladar a ratones. En nuestro caso el HOMA-IR de ratones KD Mst3 es significativamente menor que el índice para los WT, lo que confirmaría nuestra hipótesis acerca de que la falta de Mst3 sería un factor protector frente a la resistencia a insulina (figura 60B).

$$HOMA - IR = \frac{Insulina\ ayunas\ \frac{mU}{L} \times Glucosa\ ayunas\ \frac{mmol}{L}}{22,5}$$

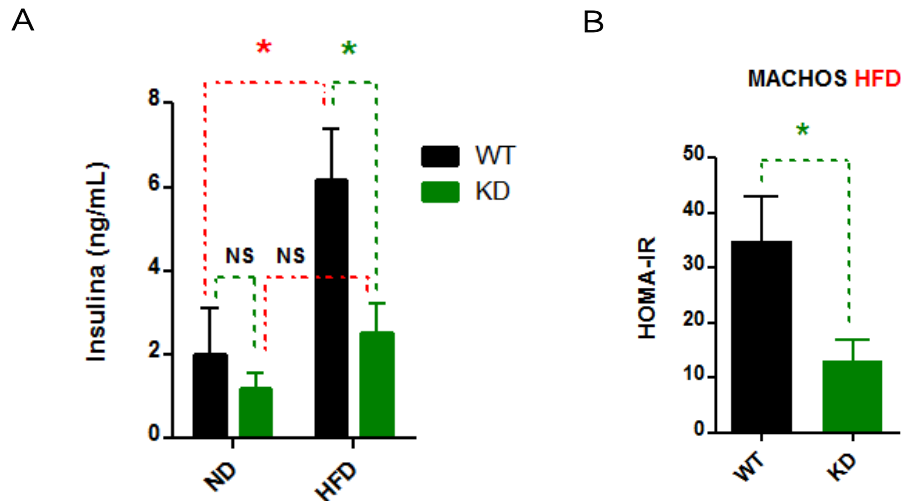


FIGURA 60. Los ratones machos HFD Mst3 KD presentan menor resistencia a insulina. A. Niveles de insulina de ratones machos Mst3 KD frente a WT, ND o HFD. La recogida de suero se realizó a partir de sangre de la cola tras un ayuno de 3 horas. El suero se analizó con un kit comercial de ELISA y los resultados se interpretaron mediante el software GRAPH PAD utilizando una curva dosis-respuesta con ecuación tipo Sigmoidal. (test t, 2 colas), (MACHO WT ND n=5, MACHO KD ND n=7 p valor=0,44) (MACHO WT HFD n=8, MACHO KD HFD n=8 p valor=0,02). (p valor WT=0,04, p valor KD=0,13) B. Índice HOMA-IR de ratones macho alimentados con HFD. Este índice se calculó a partir de los valores de insulina obtenidos para cada ratón en el ELISA con sus valores correspondientes de glucosa basal en ayunas. (test t 2 colas), (MACHO WT n=8, MACHO KD n=8 p valor=0,035).

#### 4.3.5. Expresión de genes gluconeogénicos después de HFD

Los resultados encontrados para los machos en el test de tolerancia a piruvato apoyan el posible papel de Mst3 sobre la regulación de enzimas gluconeogénicas al igual que lo encontrado para las células de hepatocarcinoma de hígado. Sin embargo, para ver este efecto *in vivo* parece necesario provocar en el ratón un tipo de estrés como el metabólico mediante la administración de una dieta alta en grasa que tiene como consecuencia la mayor activación por fosforilación de la actividad quinasa de Mst3. Bajo esta suposición, decidimos comparar nuevamente los niveles de expresión de genes gluconeogénicos en hígado de ratones alimentados con dieta alta en grasa en ausencia o presencia de Mst3. Como se puede ver en la figura 61 y a diferencia de lo que ocurría con ratones alimentados durante 8 semanas con dieta convencional (figura 46), vemos una disminución en los genes *Pck1* y *G6pc* significativa en el caso de la última. No se observan diferencias en cuanto a los genes de respuesta a ayuno ni en genes relacionados con la síntesis y transporte de ácidos

grasos indicando que el efecto de la falta de Mst3 es bastante específico sobre la gluconeogénesis y no sobre otras rutas metabólicas.

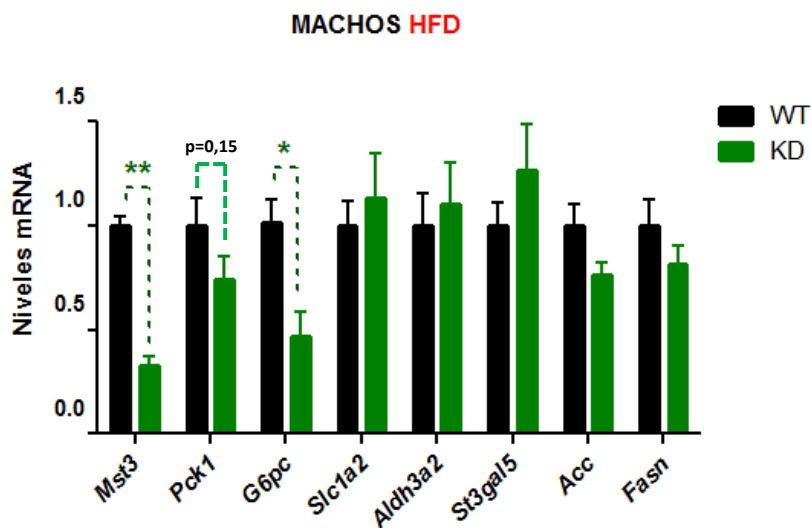


FIGURA 61. Los niveles de mRNA de *G6pc* de ratones HFD KD Mst3 son significativamente menores que los HFD WT. El mRNA se extrajo de hígados de ratones HFD sometidos a un ayuno nocturno de 14 horas y sacrificados 20' después de la inyección intraperitoneal del precursor gluconeogénico piruvato para inducir la expresión de genes gluconeogénicos. Se analizaron dichos genes gluconeogénicos mediante qPCR incluyendo los genes control o housekeeping *Actb* y *Rplp0*. (ANOVA, 2 colas con corrección de Bonferroni), (MACHO WT n=8, MACHO KD n=9 p valor *Pck1*=0,15, p valor *G6pc*=0,005, p valor *Slc1a2*=0,57, p valor *Aldh3a2*=0,68, p valor *St3gal5*=0,31, p valor *Acc*=0,07, p valor *Fasn*=0,24). Se muestran también los niveles de mRNA de Mst3. Sólo se incluyeron en la estadística aquellos ratones KD con menos del 50% de Mst3 que los WT. (p valor *Mst3*= $2,5 \times 10^{-8}$ ).

#### 4.4. Los ratones deficientes para Mst3 alimentados con una dieta HFD presentan menos triglicéridos en hígado

Además de analizar los niveles de mRNA en el hígado de nuestros ratones, se quiso ver el efecto de la administración de dieta alta en grasa en este órgano y comparar cómo afectaba la ausencia de Mst3 al proceso de esteatosis hepática. Se realizó una cuantificación relativa de los niveles de triglicéridos mediante la utilización de un kit comercial (figura 62A). Los resultados de la cuantificación mostraron niveles significativamente menores de triglicéridos en ratones KD para Mst3 con respecto a los niveles de los WT lo que parece concordar también con la mayor resistencia que presentan estos ratones a sufrir los efectos de la dieta

alta en grasa. Se realizaron tinciones de cortes histológicos con hematoxilina-eosina las cuales también muestran los hígados de los WT con un mayor grado de esteatosis que los KD (figura 62B).

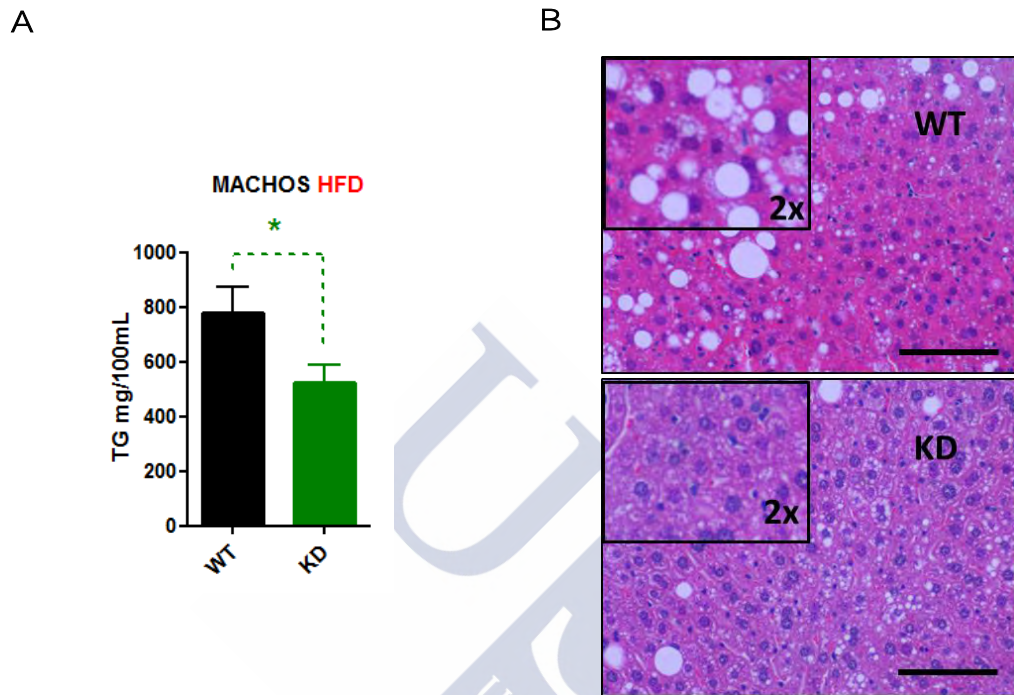


FIGURA 62. Los ratones machos HFD KD Mst3 presentan menos triglicéridos en hígado que los WT. A. Niveles de triglicéridos en hígado de WT y KD después de HFD. Se procesaron los hígados de ratones HFD KD y WT y se extrajeron los triglicéridos con un kit de SPINREACT. (test t, 2 colas), (MACHO WT ND n=8, MACHO KD ND n=9 p valor=0,041) B. Tinción representativa de hematoxilina-eosina de ratones WT y KD después de HFD. Las barras negras presentan 100 μM.

#### 4.5. Los ratones deficientes para Mst3 alimentados con una dieta HFD tienen menor cantidad de glucógeno hepático

Como se mencionaba en la introducción, tras un periodo de ayuno y como paso previo a la producción de glucosa mediante gluconeogénesis se consumen los depósitos de glucógeno hepático. Se quiso comparar si los niveles de glucógeno eran diferentes entre ratones KD y WT alimentados durante 21 semanas con HFD y se observaron diferencias significativas que indicaban una menor cantidad de glucógeno hepático con la falta de Mst3. (figura 63). El hígado analizado pertenecía a los ratones sacrificados tras un periodo

nocturno de ayuno de 14 horas donde las reservas de glucógeno ya se habrían consumido en gran parte. Por ello, y ante la posibilidad de no detectar niveles de glucógeno comprendidos dentro de la recta patrón se incluyó un control de un ratón alimentado *ad libitum* con HFD, es decir, sin ser sometido a ayuno y se observa que sus depósitos de glucógeno son sustancialmente mayores que los ratones analizados (figura 63, barra azul).

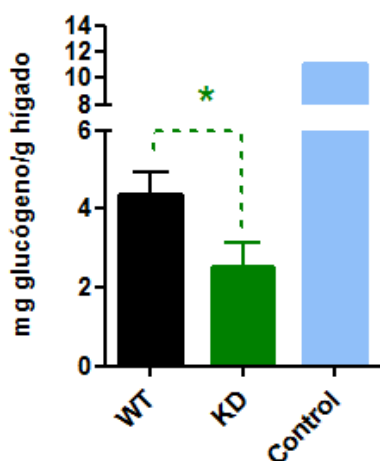


FIGURA 63. Los ratones machos HFD KD Mst3 presentan menos glucógeno en hígado que los WT. Se procesaron los hígados de ratones HFD KD y WT y se determinó la cantidad de glucógeno por mg de hígado con un kit de medición de glucógeno hepático por colorimetría. Se incluyó un ratón control alimentado *ad libitum* con HFD. (test t, 2 colas), (MACHO WT ND n=8, MACHO KD ND n=8 p valor=0,0465).

## 5. ESTUDIO A NIVEL MOLECULAR DEL EFECTO DE LA FALTA DE Mst3 SOBRE LA REGULACIÓN DE LA GLUCONEOGÉNESIS

### 5.1. La actividad del promotor de G6PC se regula por la presencia de Mst3

Con todas las evidencias obtenidas *in vivo* acerca del importante papel de Mst3 en el manejo de la gluconeogénesis y el efecto que produce su falta tras someter a los ratones a una dieta alta en grasa, cabe preguntarse a qué nivel molecular podría estar ejerciendo Mst3 dicha regulación, es decir, si estaría actuando directamente promoviendo la transcripción de genes gluconeogénicos o si sería una regulación indirecta ejerciendo su actividad quinasa sobre algún otro enzima de la ruta que conduce a la producción de glucosa en ayunas.

En primer lugar, se quiso ver el efecto que la falta de Mst3 tendría sobre la regulación de los promotores de G6PC y PCK1. Para este fin se realizaron ensayos de luciferasa mediante la transfección de células HepG2 shControl y shMst3 con los promotores de ambas



enzimas gluconeogénicas clonados en el vector pGL3. También se cotransfectaron estas células con un plásmido de expresión de Mst3 para intentar recuperar el efecto de su falta. Los resultados de la transfección de células HepG2 shcontrol y shMst3 con estos dos promotores mostraron que ante la falta de Mst3 se reduce prácticamente un 20% la actividad del promotor de G6PC y lo hace de forma significativa. Del mismo modo, cuando se sobreexpresa en estas células Mst3 exógeno, se aumenta en casi un 50% la actividad del promotor tanto en las células control como en las shMst3 (figura 64A). El hecho de que la falta de Mst3 reduzca la actividad del promotor en estas células y de que al introducir Mst3 exógeno se recupere la actividad a niveles de las células control, confirma que Mst3 tiene un efecto sobre la expresión del enzima gluconeogénico G6PC. Este experimento se realizó en paralelo para el promotor de PCK1, y aunque se logró una cierta reducción en su actividad no llegó a ser significativa. Tampoco se observa una estimulación del promotor de PCK1 al sobreexpresar Mst3 en las células tanto control como shMst3 (figura 64B). Aunque se observa un efecto significativo de Mst3 sobre la actividad de Mst3 no parece una gran diferencia que pueda explicar la considerable disminución que se encuentra en los niveles de mRNA de G6PC cuando se suprime Mst3 en estas células. Esto junto con el hecho de que tampoco encontramos diferencias significativas en cuanto al promotor de PCK1, mientras que sí las tenemos en sus niveles de mRNA en ausencia de Mst3, lleva a pensar que los promotores usados no presentan un buen funcionamiento.

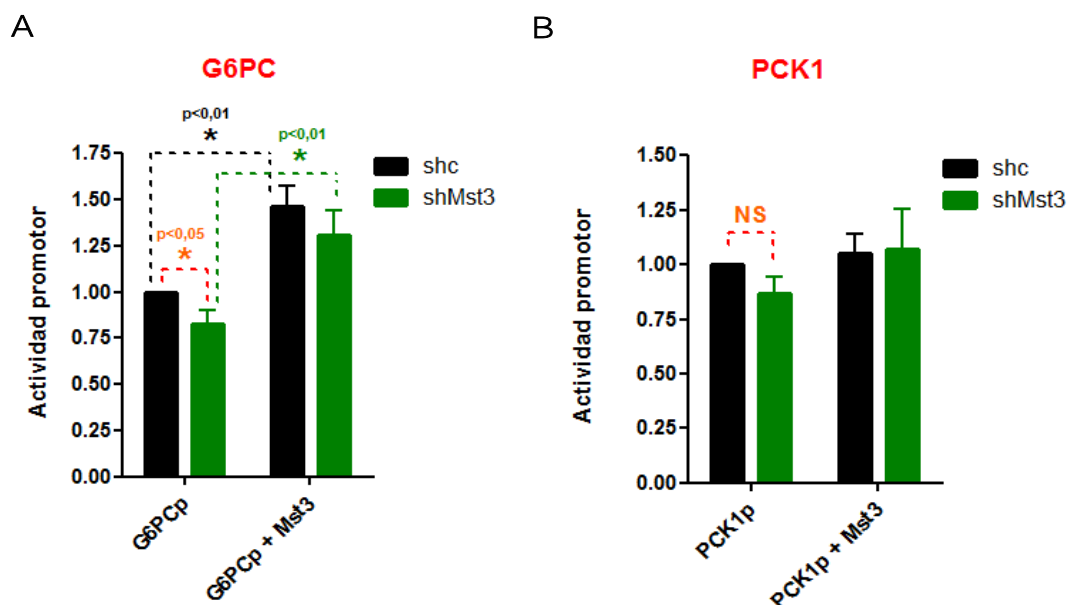


FIGURA 64. La actividad del promotor de G6PC se regula por la presencia o ausencia de Mst3. Se cotransfectaron las células HepG2 shControl o shMst3 con el vector pGL3 que contiene a cada promotor y con un vector que expresa Mst3 o vacío. Al mismo tiempo se transfectaron dichas células con un plásmido  $\beta$ -Gal de forma que todos los valores de luminiscencia producidos por el promotor se corrigieron por el valor de absorbancia producido por la  $\beta$ -Galactosidasa. También se incluyó un control con un pGL3 basic sin promotores. A. Actividad del promotor pGL3-G6PC (test t, 1 cola), (n= 11 experimentos, p valor de G6PCp =0,048) (p valor entre G6PCp y G6PCp+Mst3 de shc=0,004, p valor entre G6PCp y G6PC+Mst3 de shMst3=0,004). B. Actividad del promotor pGL3-PCK1 (test t, 1 cola) (n= 10 experimentos, p valor de PCK1p =0,12 ) (p valor entre PCK1p y PCK1p+Mst3 de shc=0,53, p valor entre PCK1p y PCK1+Mst3 de shMst3=0,19).

## 5.2. El silenciamiento de Mst3 no afecta a la vida media de G6PC

Puesto que no se obtuvo un gran efecto de Mst3 sobre la regulación de los promotores gluconeogénicos PCK1 y G6PC, se quiso ver si la disminución del mRNA de estos enzimas en las células shMst3 se debía en realidad a que la vida media del mensajero fuese menor en ausencia de Mst3 o que Mst3 fuera necesario para la estabilidad del mensajero de G6PC y PCK1. Para llevar a cabo este estudio, una manera relativamente sencilla de analizar la cinética de degradación del mRNA consiste en bloquear la transcripción celular con inhibidores como la **Actinomicina D** (interfiere con la transcripción intercalándose en el DNA). Se añade a las células actinomicina D (a concentraciones entre 5 y 10  $\mu$ M) y se mide la cantidad de mRNA persistente a varios tiempos para calcular la tasa de degradación del mRNA (Chen, Ezzeddine et al. 2008). En la figura 65 se muestra la tasa de degradación del

mRNA de G6PC y PCK1 medida en células shControl y shMst3. No se encontraron diferencias en dicha vida media independientemente de la presencia/ausencia de Mst3. Aunque en el caso de PCK1, la tendencia es a que vida media en las shMst3 sea un poco mayor que en las shcontrol, esto iría en contra de lo esperado y no explicaría los bajos niveles de mRNA de PCK1 que se encuentran en las shMst3 para esta enzima.

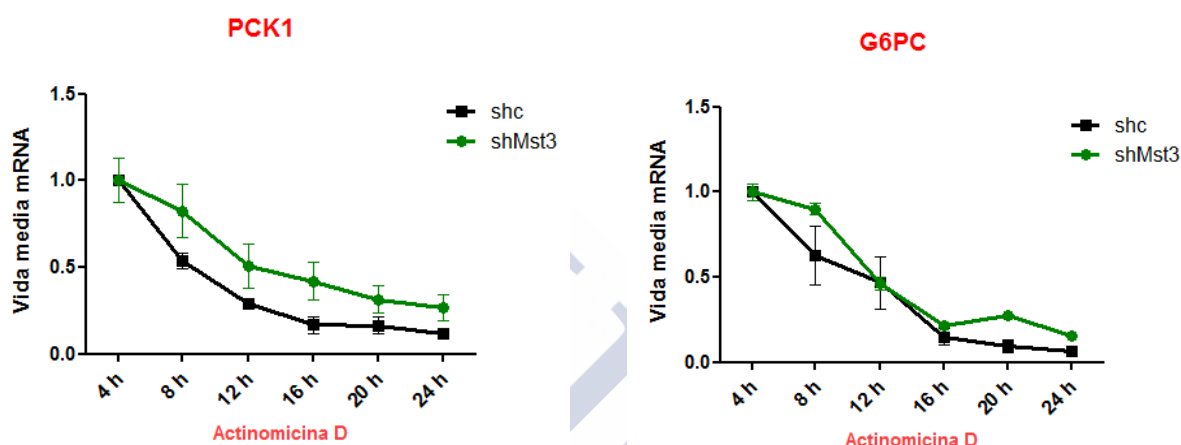


FIGURA 65. No existen diferencias en la vida media del mRNA de G6PC y PCK1 en ausencia de Mst3. Se trataron células HepG2 shcontrol o shMst3 con Actinomicina D 5 $\mu$ M durante 4, 8, 12, 16, 20 o 24 horas, se realizó una extracción de mRNA y se analizó la vida media del mRNA de G6PC y PCK1 mediante qPCR. Se usó como *housekeeping* el 18S puesto que se define como uno de los genes más estables y tiene una vida media muy larga. (test t, 2 colas) (n= 3 experimentos, p valor PCK1=0,36, p valor G6PC=0,64).

### 5.3. El silenciamiento de Mst3 afecta a la vía de respuesta a insulina aumentando la fosforilación de AKT y su sustrato FOXO1 así como la actividad de mTORC2

Lo siguiente fue realizar estudios de fosfoproteómica para tratar de saber qué quinasas podrían ver comprometida su fosforilación por la falta de Mst3. Para ello, se recurrió a un kit comercial (*Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array KIT*) que es un inmunoensayo tipo sandwich sobre membrana. Presenta una serie de anticuerpos que se distribuyen de forma punteada y por duplicado sobre una membrana de nitrocelulosa y reconocen proteínas diana específicas presentes en la muestra (figura 66). Detecta la fosforilación de las proteínas capturadas gracias a anticuerpos secundarios fosfoespecíficos y biotinilados. Por último, la señal producida se visualiza usando reactivos de detección quimioluminiscente y dicha señal se considera proporcional a la cantidad de fosforilación en el analito adherido.

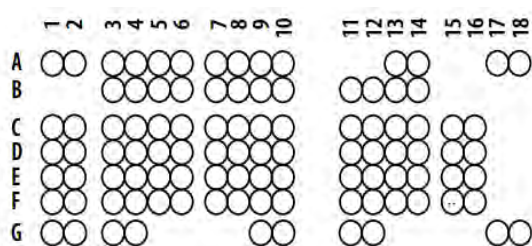


FIGURA 66. Plantilla de un array de fosfoproteínas humanas. Cada dos puntos consecutivos en la horizontal se corresponde con un anticuerpo adherido a la membrana de nitrocelulosa que reconoce fosforilaciones concretas de su proteína diana.

[https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-human-phospho-kinase-array-kit\\_ary003b#data-examples](https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-human-phospho-kinase-array-kit_ary003b#data-examples)

La incubación de este array con extractos de HepG2 shcontrol o shMst3 después de 72 horas en cultivo cuando existe una elevada tasa de producción de glucosa mediante gluconeogénesis mostró algunas diferencias de fosforilación en algunas quinasas importantes dependiendo de la ausencia o presencia de Mst3. De todas ellas, en las coordenadas B9, B10 correspondientes a AKT 1/2/3 aparece significativamente más fosforilada en S473 en las células shMst3 que en las control y en las coordenadas E5, E6 correspondientes a Fgr pTyr412 más fosforilada en las shControl (figura 67 A,B). Debido a la conocida relación de AKT con el metabolismo de la glucosa y la expresión de genes gluconeogénicos, los análisis posteriores se centraron en la vía de AKT.

A

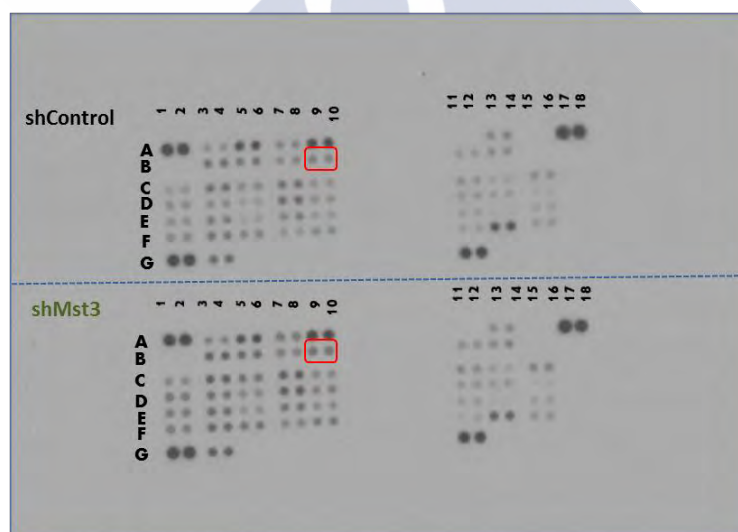


FIGURA 67. AKT 1/2/3 aparece más fosforilada en serina 473 de células shMst3 que en células control A. Array de fosfoproteínas humanas. Se incubaron las membranas que contenían a los anticuerpos primarios de fosfoproteínas humanas con extractos de células HepG2 shcontrol y shMst3 recogidos a las 72 horas de cultivo. Se reveló mediante la utilización de anticuerpos secundarios biotinilados y sustrato quimioluminiscente. El encuadre rojo muestra los duplicados correspondientes a AKT 1/2/3 fosforilada en Ser 473. B. Cuantificación relativa de las fosfoproteínas más relevantes del array. (Siguiendo página). La densitometría se realizó mediante el programa Image J, se corrigieron los valores de cada punto por los controles incluidos en la propia membrana y se relativizó el valor de las shMst3 al valor de las shControl.

B



El haber encontrado AKT más fosforilado en Ser 473 para las células shMst3 que para las shControl resultó muy interesante desde el punto de vista de que una de las rutas más relevantes en el control de la gluconeogénesis es la vía de señalización de la insulina, donde AKT es un elemento central. Como se explica en la introducción, si se considera que en ayunas los bajos niveles de insulina impiden que AKT se fosforile y por tanto consiguen que su sustrato FOXO1 pueda entrar en el núcleo para promover la expresión de genes gluconeogénicos, parece lógico pensar que en las células shMst3 donde AKT está más fosforilado, la expresión de genes gluconeogénicos se vea comprometida.

A fin de corroborar el resultado del array de proteínas, se decidió realizar un estudio más detallado acerca de los niveles de fosforilación de las principales proteínas de la vía de la insulina en presencia o ausencia de Mst3. Se realizaron WB para el receptor de insulina (IR), el sustrato del receptor de insulina (IRS1), la propia AKT y FOXO1, tanto para sus estados fosforilados como para proteína total comparando células shcontrol y shMst3 tratadas o sin tratar con insulina (figura 68A). Los resultados de la densitometría de estos WB confirman que existe una mayor fosforilación de AKT en la serina 473 y en la treonina 308, en ausencia de Mst3 (ambas fosforilaciones son necesarias para la total activación de AKT) y también se encuentra aumentada la fosforilación en el sustrato de AKT FOXO1 tanto en la treonina 24 y la serina 256 de células shMst3.

mTORC2 es un complejo proteico también importante para la activación de AKT y lo puede hacer fosforilándola directamente sobre la treonina 308 o través de la fosforilación ejercida por su sustrato SGK1 en la ser 473. Por ello, se analizó la fosforilación del sustrato de SGK1 llamado NDRG1 para su fosforilación en treonina 346 el cual se considera un buen biomarcador de la actividad de mTORC2 (Garc and Alessi 2008, Toker and Marmiroli 2014) y se encontró también que la fosforilación de NDRG1 en su treonina 346 está aumentada en las células shMst3.

Sin embargo, estas diferencias significativas desaparecen al tratar las células con insulina indicando que la regulación de Mst3 sería más importante en situaciones de ayunas donde los niveles de insulina son limitantes y donde se requiere la síntesis de glucosa por gluconeogénesis. Por otro lado, proteínas *upstream* de AKT como el sustrato del receptor de



insulina IRS1 no muestran cambios significativos en ausencia de Mst3 o sorprendentemente tampoco las presentan otros sustratos *downstream* como GSK3 $\beta$ , lo que define un poco más el posible lugar de acción de Mst3 regulando a G6PC y PCK1 a nivel de AKT o su sustrato FOXO1 (figura 68C).

#### **5.4. El silenciamiento de Mst3 no afecta a otras vías metabólicas importantes o a determinadas vías MAPK**

En paralelo se quiso analizar la afectación de otras proteínas implicadas en vías importantes del metabolismo por la falta de Mst3. Una de ellas fue AMPK, (*AMP-activated protein kinase*) que actúa como sensor regulando el metabolismo celular ante la falta de nutrientes, promoviendo por un lado tanto la oxidación de lípidos como la captación de glucosa y por otro apagando procesos como la síntesis de lípidos o glucosa (Long and Zierath 2006). Otra de ellas, ERK 1/2, se activa por insulina junto con AKT/PKB para promover no sólo proliferación celular y supervivencia, sino también la translocación de vesículas Glut4 y la captación de glucosa en los tejidos más relevantes (Ruiz-Alcaraz, Lipina et al. 2013). Teniendo en cuenta el hecho de que algunas quinasas están implicadas en la cascada de señalización MAPK de la que forma parte ERK 1/2 (Sugden, McGuffin et al. 2013), nos llevó a querer ver el estado de fosforilación tanto de ERK1/2 como AMPK en ausencia de Mst3 y como se observa en la figura 68B y en su cuantificación por densitometría en la figura 68C no existen diferencias significativas entre células shControl y shMst3.



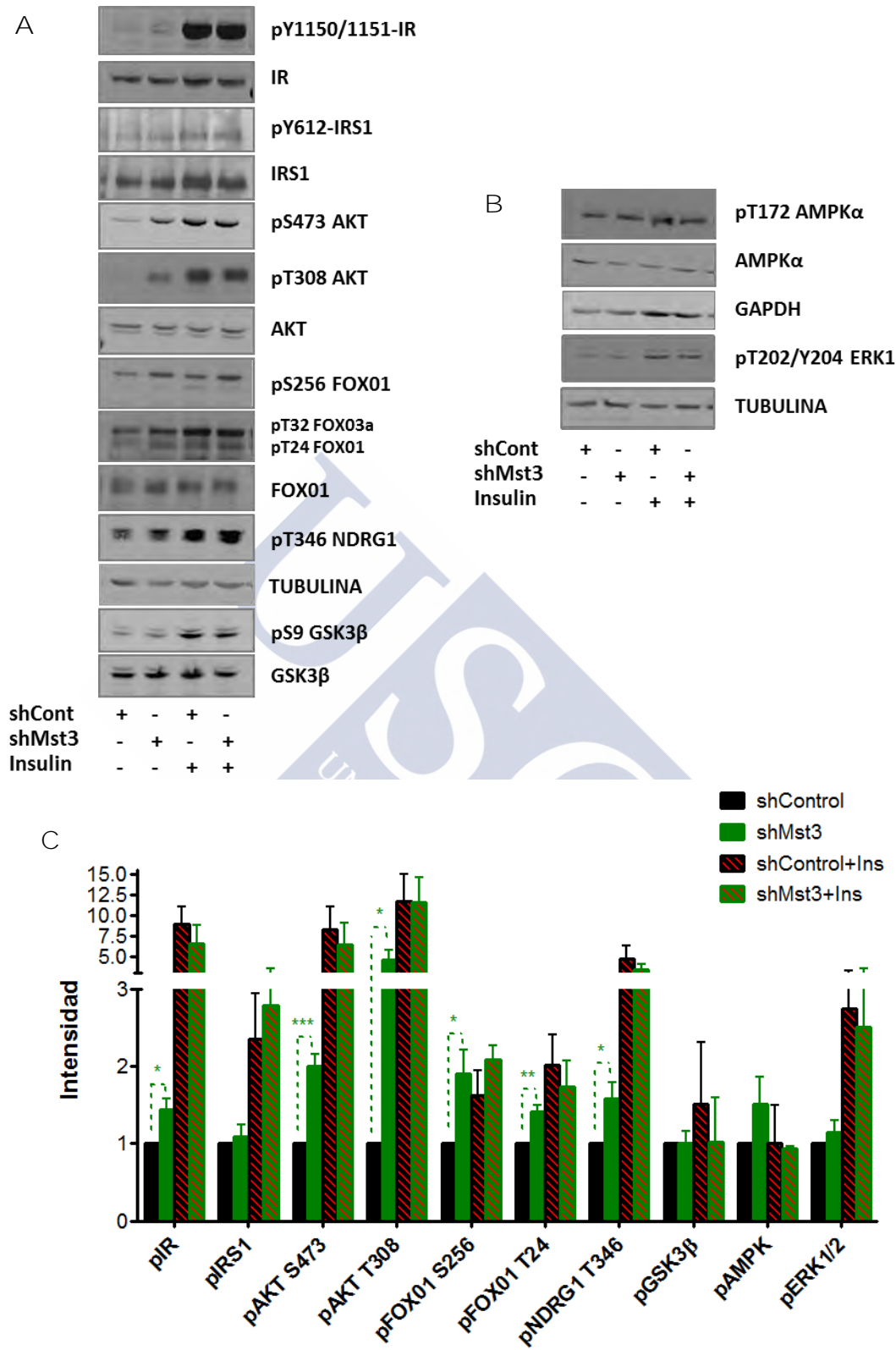


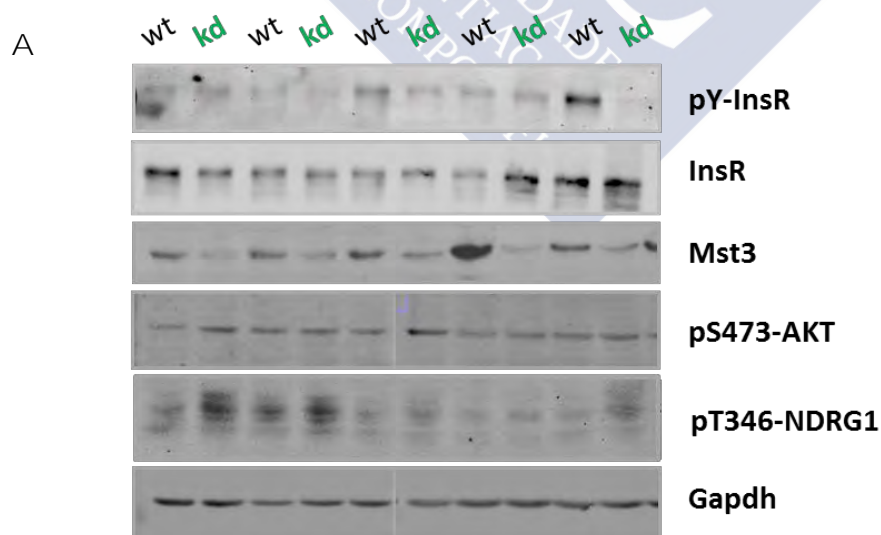
FIGURA 68. Las fosforilaciones de AKT, su sustrato FOXO1 y NDRG1 están aumentadas en ausencia de Mst3. Se recogieron extractos de células shcontrol y shMst3 serodeprivadas 24 horas o serodreprivadas 24 horas y tratadas con insulina 100 nM durante 20 minutos. A. WB de las principales proteínas fosforiladas de la vía de insulina. Se muestran las proteínas fosforiladas y sus correspondientes controles de proteína total. B. WB de

## Resultados

AMPK y ERK 1/2 fosforiladas. Se muestran las proteínas fosforiladas y sus correspondientes controles de proteína total o Tubulina/Gapdh. C. Cuantificación relativa de las fosfoproteínas de la vía de insulina. La densitometría se realizó mediante el programa Image J, se corrigieron los valores de cada banda por su valor de proteína total y se relativizó el valor de las shMst3 al valor de las shControl. (test t, 2 colas) (n= 3 experimentos mínimo, p valor pIR=0,013, p valor pAKT S473=0,0002, p valor T308=0,046, p valor pFOXO1 S256=0,02, p valor pFOXO1 T24=0,002, p valor NDRG1 T346=0,018).

### 5.5. Ratones KD Mst3 tienen aumentada la fosforilación de AKT y NDRG1

Para saber si la falta de Mst3 tenía el mismo efecto sobre la señalización de la ruta de la insulina como ocurría en células en cultivo, se compararon en los hígados de ratones HFD los niveles de fosforilación tanto del receptor de insulina (IR) como de AKT. El receptor de insulina presentaba cierta tendencia a estar más fosforilado en los ratones WT que en KD Mst3, lo que podría estar reflejando su estado de hiperinsulinemia (figura 69A,B). A pesar de ello, la fosforilación de AKT en Ser 473 y de NDRG1 en T346 era mayor en los animales deficientes para Mst3 lo que es consecuente con los menores niveles de mRNA de G6PC en hígado anteriormente mostrados (figura 61). Mst3 puede estar ejerciendo un bloqueo de la señalización de la insulina *downstream* del receptor y su falta es capaz de causar la activación de la señalización de insulina independientemente del estado del receptor de insulina.



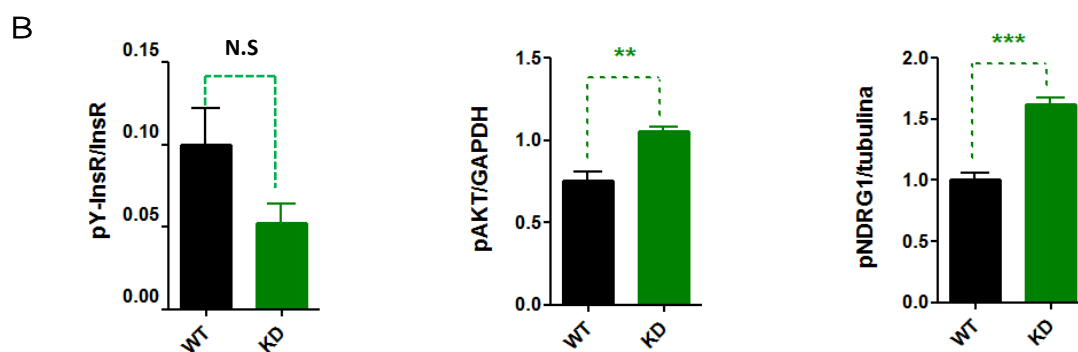


FIGURA 69. La fosforilación de AKT y NDRG1 e está aumentada en ratones deficientes para Mst3. Se extrajo proteína de hígado de ratones que habían sido sometidos un periodo de ayunas de 14 horas y 20 minutos tras la inyección intraperitoneal de piruvato a una dosis de 1,25g/kg peso corporal A. Inmunoprecipitación de IR y WB para su fosforilación en tirosina, WB para la fosforilación en serina 473 de AKT y WB para Mst3 de cada ratón. Se muestra como control de carga Gapdh. B. Cuantificación relativa de las fosfoproteínas InsR y AKT. Se cuantificaron las imágenes mediante el programa Image J, se corrigieron los valores de proteína fosforilada IR por IR total y las los valores de pSer473-AKT y pT346-NDRG1 por su valor de GAPDH. (test, 2 colas), (MACHO WT HFD n=5, MACHO KD HFD n=5 p valor pSer473-AKT/Gapdh=0,0011, p valor pY-InsR/InsR=0,097, p valor pNDRG1/tubulina<0,0001).

### 5.6. La regulación de Mst3 sobre genes gluconeogénicos se produce cuando los niveles de insulina son bajos

Como se ha visto, este estudio sugiere que Mst3 tiene un efecto sobre la regulación de enzimas de la vía de insulina cuando los niveles de esta hormona son bajos, que es, en el caso de los ratones, después de un periodo de ayunas y en el caso de las células HepG2, en una situación en la que consideramos que se ha agotado la glucosa del medio después de haber permanecido 72 horas en cultivo sin cambiarles el medio. En cambio, al añadir insulina al medio de cultivo, las diferencias de fosforilación de proteínas de la vía de insulina en ausencia de Mst3 desaparecen. Se quiso comprobar que esto era trasladable a nivel de expresión de los genes gluconeogénicos G6PC y PCK1. Por ello, se recogieron extractos para mRNA de estas células tanto en condiciones de baja glucosa como tratadas con insulina. Los resultados mostraron que efectivamente, en condiciones donde la gluconeogénesis está estimulada por la baja cantidad de glucosa y por la ausencia de insulina en el medio, los genes G6PC y PCK1 presentaban menores niveles de expresión en células shMst3 con

respecto a las shcontrol mientras que al darles insulina se inhibían por igual en ambos tipos de células (figura 70).

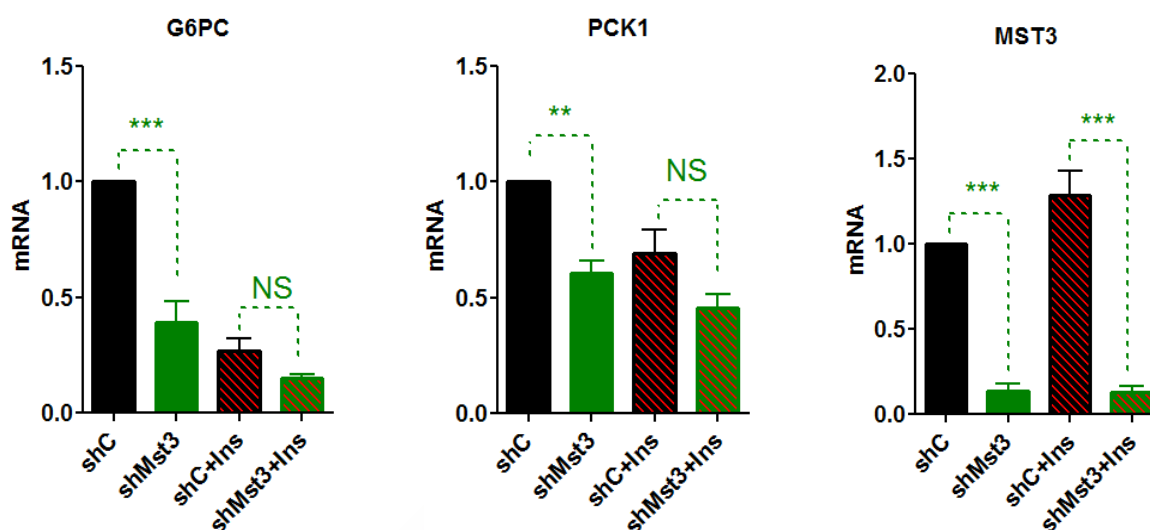
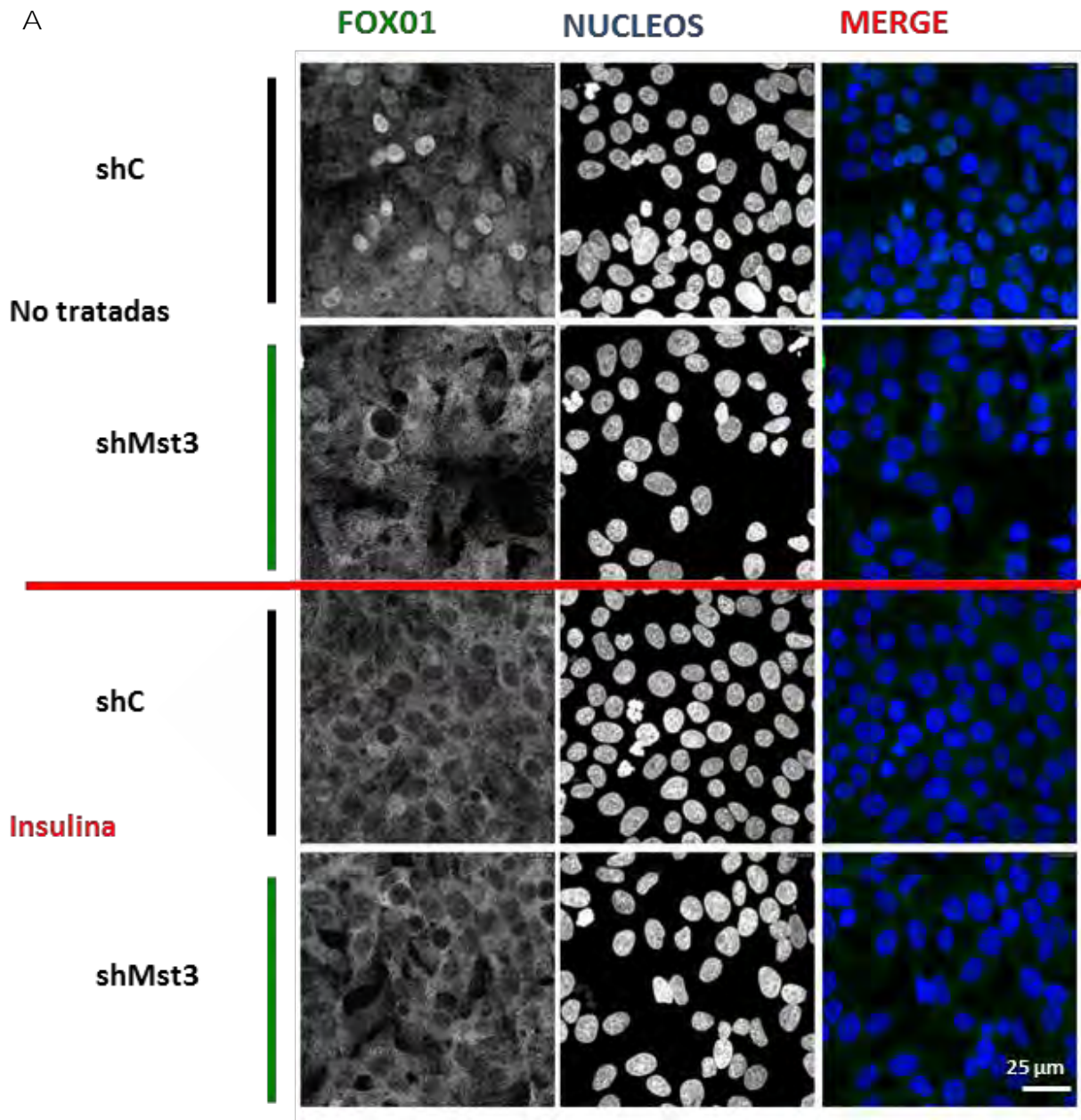


FIGURA 70. En ausencia de Mst3 y con bajos niveles de insulina la expresión de G6PC y PCK1 es menor. Se recogieron extractos de células shcontrol y shMst3 tras 72 horas en cultivo tratadas o sin tratar con insulina 100 nM durante 20 min. Se analizó el mRNA de PCK1 y G6PC así como el propio Mst3 mediante PCR a tiempo real incluyendo los genes control o housekeeping ACTB y RPLP0. (ANOVA, 1 cola con corrección de Bonferroni). (n= 4 experimentos p valor G6PC<0,0001, p valor PCK1<0,01). Se muestran también los niveles de mRNA de Mst3. (p valor<0,0001 con o sin insulina).

### 5.7. En ausencia de Mst3 se produce una menor entrada de FOXO1 al núcleo para promover la expresión de genes gluconeogénico

Para ara comprobar si este resultado se correlacionaba directamente con la capacidad de FOXO1 de entrar en el núcleo a promover la expresión de genes gluconeogénicos de forma distinta en presencia o ausencia de Mst3, se realizaron inmunofluorescencias para este factor de transcripción el cuál bajo estimulación con insulina, es fosforilado por AKT promoviendo su salida al citoplasma donde permanece unido a la proteína 1433ζ. Por el contrario, en situaciones de ayuno, cuando los niveles de insulina son bajos, AKT no fosforila a FOXO1 y este se queda en el núcleo para promover la expresión de PCK1 y G6PC. Las inmunofluorescencias confirmaron que entra menos FOXO1 al núcleo en condiciones de falta de insulina en las células shMst3 (figura 71A) y la relación entre el FOXO1 nuclear y el FOXO1 citoplasmático es también es significativamente menor (figura 71B).





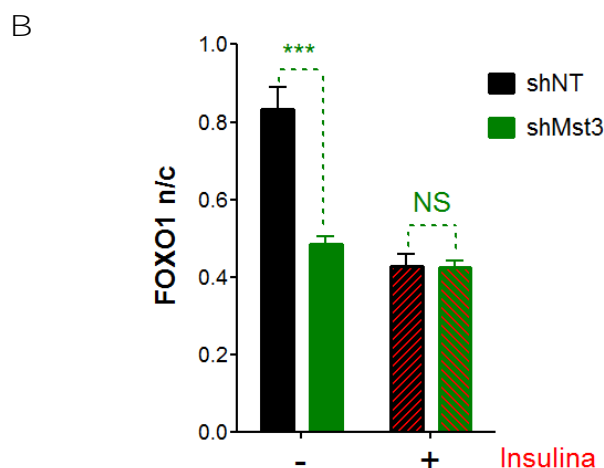


FIGURA 71. Las células shMst3 presentan menores niveles de FOXO1 nuclear en ausencia de insulina. Se sembraron células shControl y shMst3 sobre cubres pretratados con Poli-L-Lisina, a las 72 horas se trató con insulina 100 nM durante 20 minutos a la mitad de los cubres mientras que la otra mitad se dejaron sin tratar. A. Imágenes de microscopía confocal. Se fijaron las células con paraformaldehído 4%, se incubaron con anticuerpo primario  $\alpha$ -FOXO1 y posteriormente con un anticuerpo secundario unido a fluoróforo verde (Alexa-488) y el marcador nuclear de DNA azul Hoestcht 33342 (azul). Se muestran imágenes de microscopía confocal de campos representativos, obtenidas utilizando un objetivo de 63X. La escala representa 25  $\mu$ m. B. Cuantificación de la cantidad de FOXO1 nuclear. Se analizaron las imágenes mediante el software Image J. (ANOVA, 2 colas con corrección de Bonferroni) (n=7 imágenes por condición, p valor<0,001).

### 5.8. El efecto de Mst3 sobre la vía de insulina depende de PI3K

Para corroborar que realmente la regulación de Mst3 sobre los genes gluconeogénicos se produce a través de la vía de señalización de la insulina y si era dependiente de la actividad de PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*), se trataron ambos tipos de células con **LY294002** que es un potente inhibidor de PI3K permeable a las células y que actúa sobre su sitio de unión a ATP. Como consecuencia PI3K no puede dar lugar a la activación de AKT/PKB lo que se refleja tanto en los WB y densitometrías de AKT fosforilada como de su sustrato FOXO1 fosforilado y de NDRG1 fosforilado (figura 72A,B). Sin embargo, parece que la inhibición de la fosforilación de AKT/FOXO1/NDRG1 es independiente de la falta de Mst3 y se inhibe por igual tanto en las células shControl como en las shMst3 demostrando que el efecto de Mst3 en la ruta de la insulina depende de la actividad de PI3K (figura 72B).

Parece que en condiciones de baja insulina Mst3 estaría actuando como inhibidor de la fosforilación de AKT permitiendo que la gluconeogénesis tenga lugar. Esto explicaría el que

por el contrario, en las células deficientes para Mst3, tengamos una mayor fosforilación de AKT y como consecuencia, una menor expresión de G6PC y PCK1. Para corroborar esta hipótesis se analizaron también los mRNAs de G6PC y PCK1 en presencia o ausencia de LY294002. Se observa que el inhibidor aumenta de forma significativa la expresión de G6PC, pero en el caso de las shMst3 no se alcanzan los mismos niveles de expresión que se alcanzan en las shControl. En cuanto a PCK1 no conseguimos aumentar significativamente su expresión tras el inhibidor ni en las shControl ni en las shMst3 (figura 73).

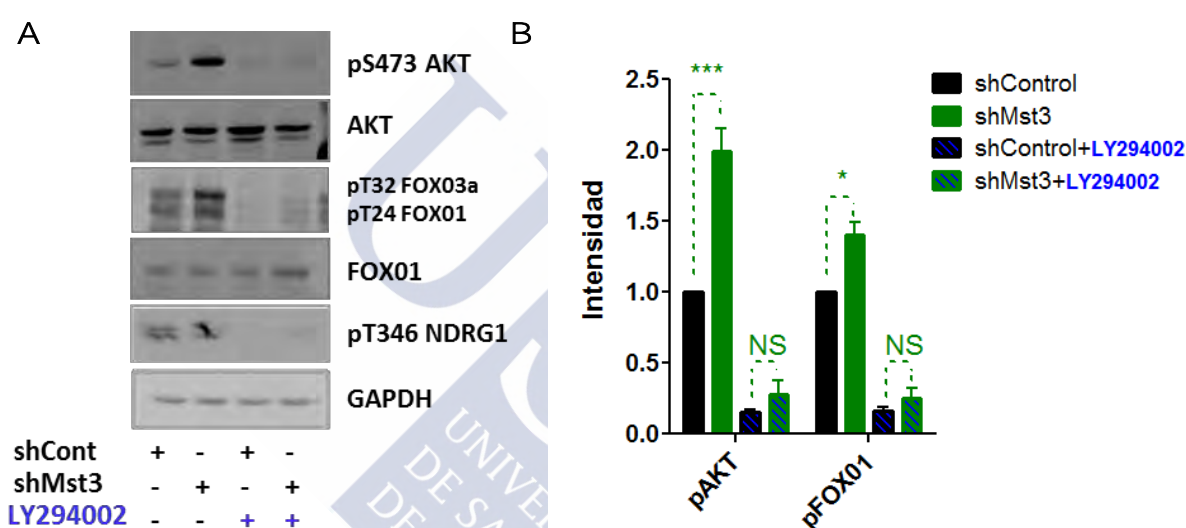


FIGURA 72. La inhibición de PI3K inhibe la fosforilación de AKT, FOXO1 y NDRG1 independientemente de Mst3. Se sembraron células shControl y shMst3, tras 72 horas en cultivo se trataron con LY294002 10 $\mu$ M o DMSO durante 8 horas y finalmente se recogieron extractos proteicos. A. WB de células shControl y shMst3 tratadas con o sin inhibidor LY294002. Se muestra GAPDH como control de carga así como las proteínas totales. B. Cuantificación por densitometría de pS473 AKT, pT24 FOXO1 y pT346 NDRG1. La densitometría se realizó mediante el programa Image J, se corrigieron los valores de cada banda por su valor de proteína total y se relativizó el valor de las shMst3 al valor de las shControl. (ANOVA, 2 colas con corrección de Bonferroni) (pS473 AKT n mínimo=3 p valor<0,001, pT24 FOXO1 n=3, p valor<0,05).



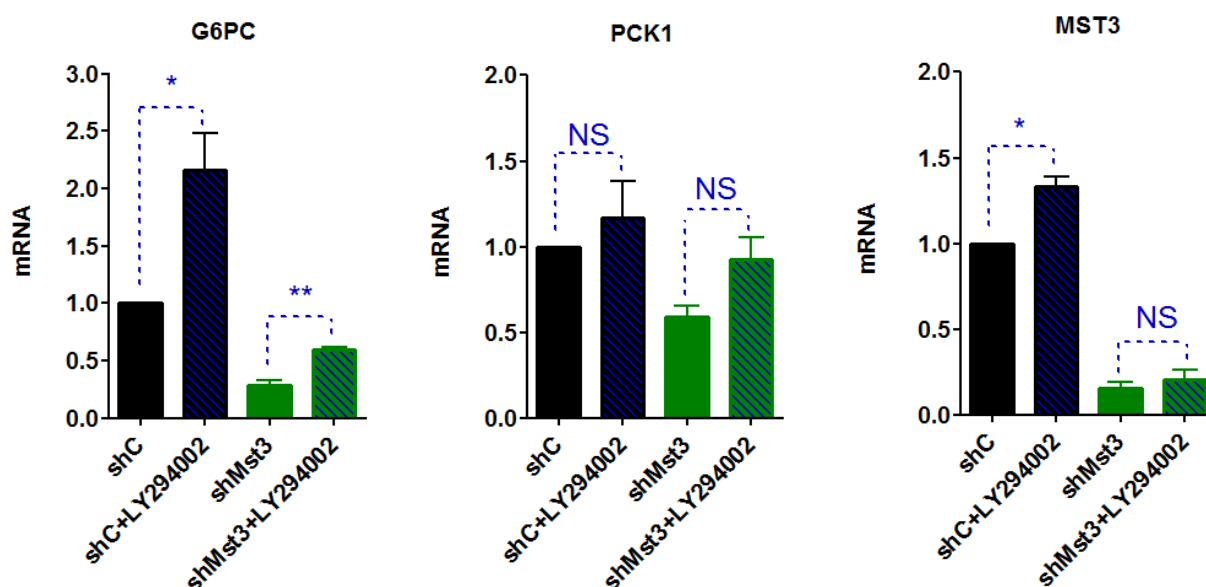
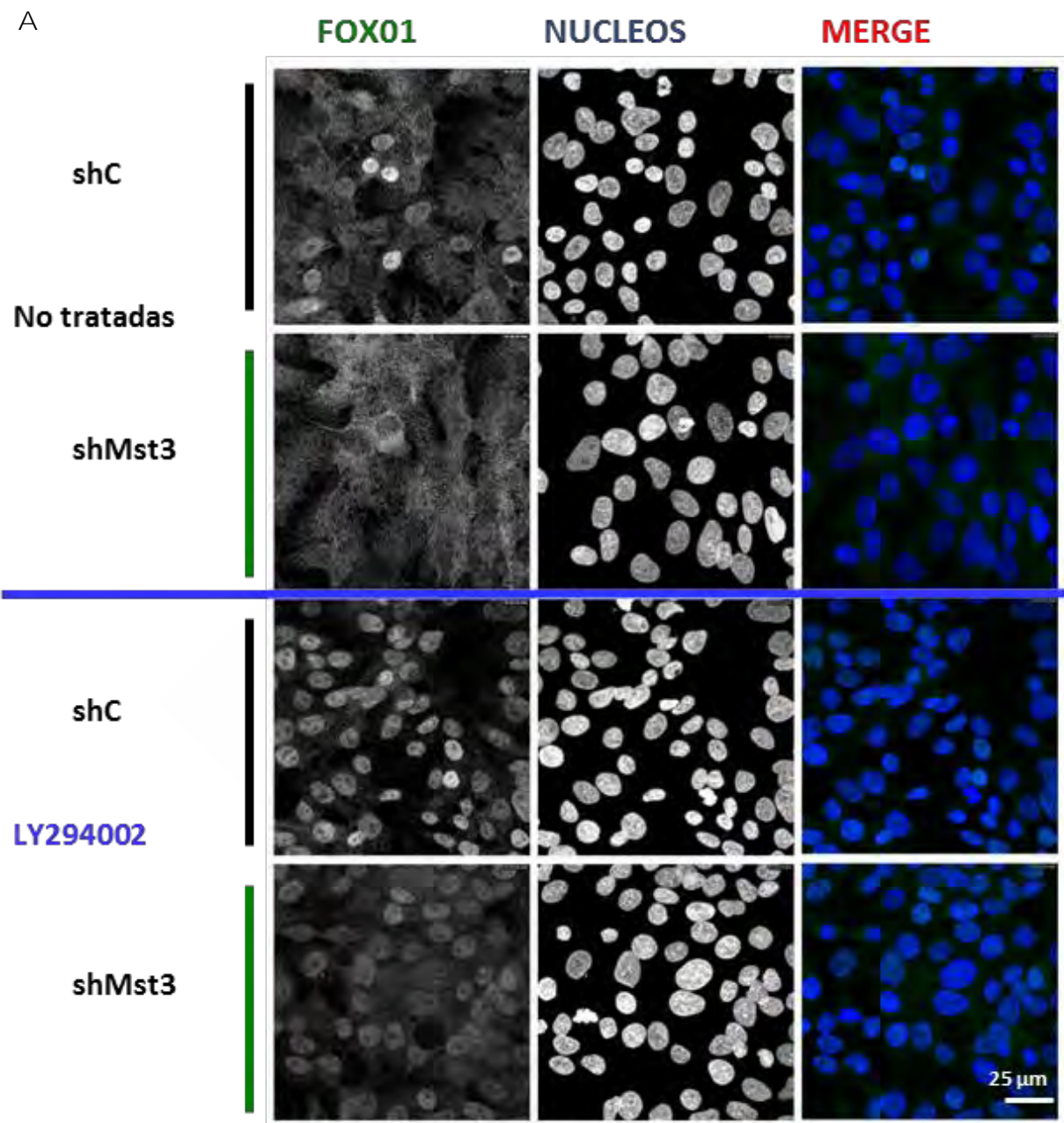


FIGURA 73. La inhibición de PI3K aumenta significativamente la expresión de G6PC en ambos tipos de células aunque en las shMst3 no se recuperan los niveles de las shControl. Se recogieron extractos de células shcontrol y shMst3 tras 72 horas en cultivo tratadas o sin tratar con LY294002 10  $\mu$ M 8 horas. Se analizó el mRNA de PCK1 y G6PC así como el propio Mst3 mediante PCR a tiempo real incluyendo los genes control o housekeeping ACTB y RPLP0. (test t, 2 colas). (n= 4 experimentos p valor G6PC shc < 0,04, p valor G6PC shMst3<0,002).

### 5.9. En ausencia de Mst3 se produce una menor entrada de FOXO1 al núcleo tras la inhibición de PI3K

Al igual que lo realizado anteriormente para ver la localización núcleo/citoplasma de FOXO1 tras el tratamiento con insulina se realizó la misma aproximación a través de inmunofluorescencias tratando las células con el inhibidor LY294002. Al impedir la fosforilación de AKT se impide como consecuencia la fosforilación de FOXO1 de forma que este puede permanecer en el núcleo para promover la expresión de genes gluconeogénicos. Como vemos en las imágenes de confocal de la figura 74A al tratar las células tanto shcontrol como shMst3, FOXO1 se internaliza prácticamente por completo, aunque lo hace en menor medida en las células deficientes para Mst3 (figura 74B). El hecho de que llegue menos FOXO1 al núcleo parece una explicación coherente de porqué los niveles de mRNA de PCK1 y G6PC son menores en las células shMst3 ya que no se puede promover su expresión al nivel de las shControl.



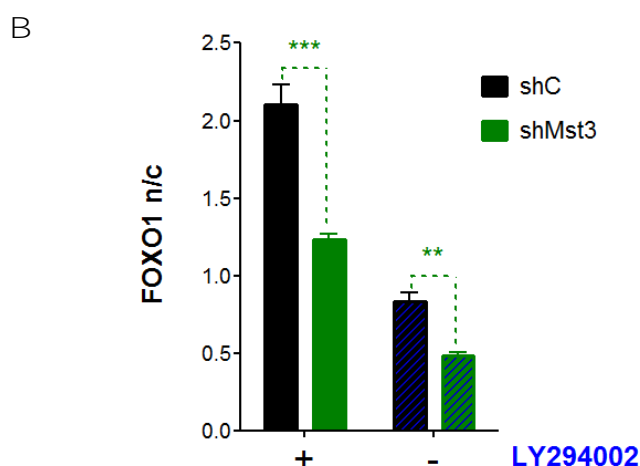


FIGURA 74. Las células shMst3 presentan menores niveles de FOXO1 nuclear al tratarlas con LY294002. Se sembraron células shControl y shMst3 sobre cubres pretratados con Poli-L-Lisina, a las 72 horas se trató con LY294002 10  $\mu$ M durante 50 minutos a la mitad de los cubres mientras que la otra mitad se dejaron sin tratar. A. Imágenes de microscopía confocal. Se fijaron las células con paraformaldehído 4%, se incubaron con anticuerpo primario  $\alpha$ -FOXO1 y posteriormente con un anticuerpo secundario unido a fluoróforo verde (Alexa-488) y el marcador nuclear de DNA azul Hoestcht 33342 (azul). Se muestran imágenes de microscopía confocal de campos representativos, obtenidas utilizando un objetivo de 63X. La escala representa 25  $\mu$ m. B. Cuantificación de la cantidad de FOXO1 nuclear. Se analizaron las imágenes mediante el software Image J. (ANOVA, 2 colas con corrección de Bonferroni) (n=7 imágenes por condición, células tratadas p valor<0,001, células sin tratar p valor<0,01).

#### 5.10. Mst3 es importante no sólo para la regulación de genes gluconeogénicos con bajos niveles de insulina sino también en respuesta a AMPc.

En condiciones de ayuno, cuando los niveles de glucagón y glucocorticoides son elevados y los de insulina reducidos, se desencadena la señalización mediada por AMPc como segundo mensajero para dar lugar a la actuación de quinasas como PKA la que a su vez promueve la fosforilación y activación del factor de transcripción CREB. Todo ello tiene como consecuencia la mayor expresión de PGC-1 $\alpha$  y finalmente este es capaz de promover la expresión de genes gluconeogénicos PCK1 y G6PC. PGC-1 $\alpha$  también conocido como PPARGC1 es un coactivador transcripcional que interacciona con FOXO1 para ejecutar el programa de la gluconeogénesis estimulando la expresión de G6PC y PCK1 (Puigserver, Rhee et al. 2003), (Barthel and Schmolli 2003).

En primer lugar se quiso ver cómo afectaba la falta de Mst3 a la expresión de PCK1 y G6PC inducida mediante la administración con un conocido activador análogo de AMPc, dbcAMP (*dibutyryl cyclic AMP*), en presencia o ausencia de un compuesto conocido como **H89** (*N-[2-bromocinnamylamino) ethyl]-5-isoquinoline sulfonamide*), que es un selectivo y potente inhibidor de PKA que actúa bloqueando el sitio activo de la enzima. PKA es una quinasa ubicua en la célula que actúa fosforilando residuos de serina y treonina en respuesta a AMPc y es otra de las enzimas clave junto con AKT que contribuyen a la regulación de la gluconeogénesis (Lochner and Moolman 2006). La figura 75A muestra como tanto PCK1 como G6PC se estimularon perfectamente con dbcAMP de una forma dependiente de PKA en células shControl, pero no en células shMst3, demostrando que Mst3 no sólo es importante para la regulación génica de la gluconeogénesis mediada por bajos niveles de insulina, sino también en respuesta a AMPc. Además, parece que tal efecto no es debido a una falta de respuesta general de las células shMst3 a este segundo mensajero. Como se ve en la figura 75B, el factor de transcripción CREB se fosforila normalmente tras el tratamiento con AMPc en ausencia de Mst3, así como se estimula perfectamente la expresión del coactivador transcripcional PGC1- $\alpha$  (figura 75A).

Seguidamente se procedió a estudiar el efecto de la inhibición de PI3K en la expresión de genes gluconeogénicos estimulados por tratamiento con dbcAMP conjuntamente con el inhibidor de PI3K LY294002. La figura 76 muestra que la inhibición de PI3K logra estimular significativamente los niveles de expresión de PCK1 y G6PC en presencia de AMPc, pero lo hace a niveles menores en las células shMst3 que las células control.

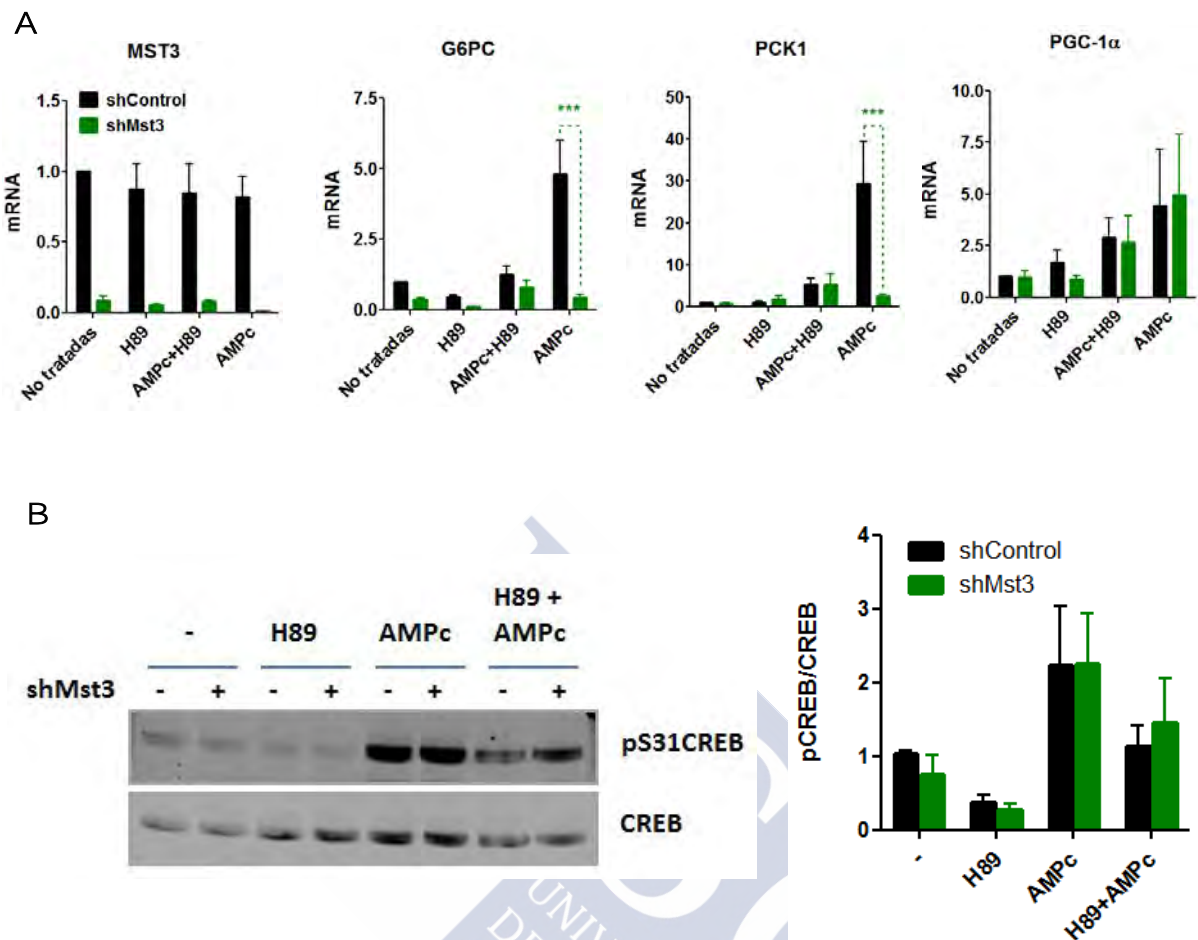


FIGURA 75. Mst3 es importante para la regulación de la gluconeogénesis mediada por AMPc. Se recogieron extractos de células shControl y shMst3 tras 72 horas en cultivo tratadas o sin tratar con H89 10  $\mu$ M durante 8 horas y/o dbcAMP 1 mM durante 2 horas. A. mRNA de genes gluconeogénicos en respuesta a AMPc y H89. Se analizó el mRNA de PCK1 y G6PC así como el propio Mst3 y PGC1- $\alpha$  mediante PCR a tiempo real incluyendo los genes control o housekeeping ACTB y RPLP0. (ANOVA, 2 colas) (n= 4 experimentos p valor G6PC < 0,001, p valor PCK1 <0,001). B. WB de pSer31-CREB y CREB total. La densitometría se realizó mediante el programa Image J, se corrigieron los valores de cada banda por su valor de proteína total y se relativizó el valor de las shMst3 al valor de las shControl. (Gráfica izquierda). (ANOVA, 2 colas) (n=3 experimentos).



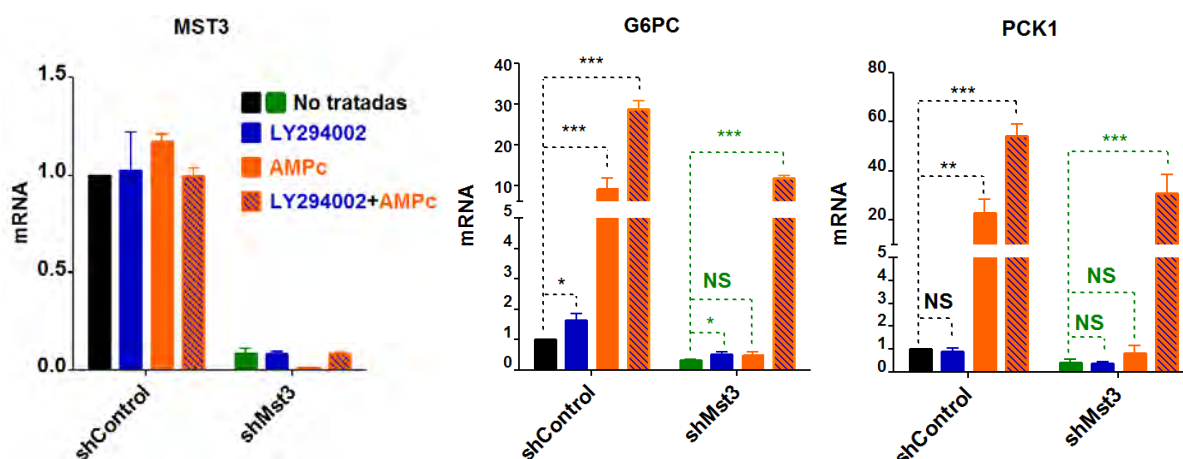


FIGURA 76. Mst3 es importante para que el inhibidor de PI3K pueda inducir la respuesta de PCK1 y G6PC a AMPc. Se recogieron extractos de células shControl y shMst3 tras 72 horas en cultivo tratadas o sin tratar con LY294002 10  $\mu$ M durante 8 horas y/o AMPc 1 mM durante 2 horas. Se analizó el mRNA de PCK1 y G6PC así como el propio Mst3 mediante PCR a tiempo real incluyendo los genes control o housekeeping ACTB y RPLP0. (ANOVA, 2 colas con corrección de Bonferroni) (n= 3 experimentos \*\*\*p valor < 0,001, \*\*p<0,01).

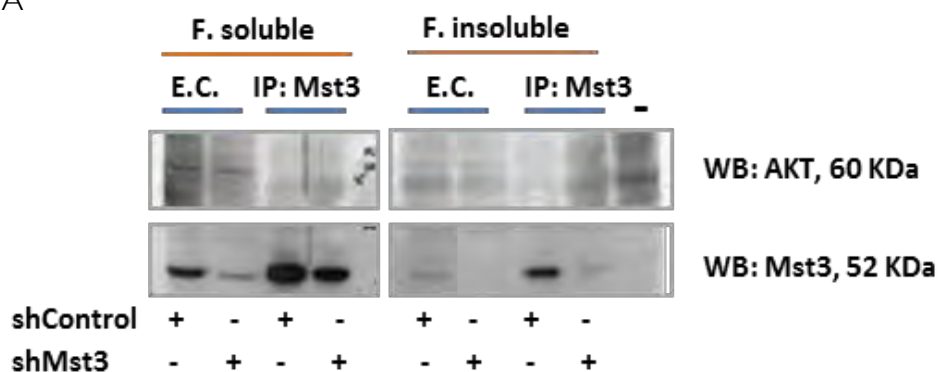
#### 5.11. No se detecta interacción endógena y en sobreexpresión entre AKT y Mst3

Todos estos resultados en cultivo de células de hepatocarcinoma muestran que la falta de Mst3 produce la hiperactivación por fosforilación del eje AKT/FOXO1 y mTORC2 cuando la señalización por insulina es baja y esto tiene como consecuencia el bloqueo de la respuesta transcripcional a AMPc de los genes gluconeogénicos PCK1 y G6PC. Esto parece indicar que, en condiciones de baja insulina, Mst3 inhibe la fosforilación directa o indirecta de algunas de las proteínas que conforman este eje regulador de la gluconeogénesis. El hecho de que proteínas proximales de este eje como IRS1 no estén significativamente más fosforiladas en ausencia de Mst3 como ocurre con AKT, hace pensar en la posibilidad de una interacción directa entre ambas proteínas. Esto cobraba sentido con los resultados mostrados por (Cinar, Fang et al. 2007) en los que se describe la interacción directa entre AKT y MST1/STK4 (una proteína de la subfamilia de Mst3) dentro de un complejo multiproteico aislado en la fracción celular conocida como balsas lipídicas (*lipid rafts*) de células humanas de cáncer de próstata. Aunque la localización de AKT se reparte entre núcleo y citoplasma y Mst1 se encuentra fundamentalmente citoplásmico, en esta publicación calculan que un 10% del AKT1 no nuclear se encuentra en balsas lipídicas

interaccionando de forma endógena con Mst1. Parece además que dicha interacción es bastante exclusiva de esta fracción celular y que Mst1 estaría ejerciendo sus acciones como enzima proapoptótica inhibiendo la fosforilación/activación de AKT1 y contrarrestando por tanto las acciones proliferativas de esta.

Debido a la similitud de los dominios quinasa y de las funciones de las proteínas de la familia de las Msts y a que Mst3 según lo descrito en este trabajo también ejerce un efecto inhibitorio sobre la fosforilación de AKT, parece probable una interacción directa AKT-Mst3 de la misma forma que ocurre para Mst1. En la figura 77 se muestran inmunoprecipitaciones tanto para AKT1 como para Mst3 en células shControl y shMst3 que se realizaron siguiendo los protocolos de Cinar (apartado 14 Mat & Met). Para cada extracto se obtuvo una fracción celular soluble en Tritón X-100 donde se encontraría la mayor parte de AKT1 y Mst3 pero que sería el control negativo de la interacción y una fracción insoluble en Tritón X-100, pero soluble en *octylglucoside*, ((OCG)-soluble fractions) correspondientes a las balsas lipídicas donde se esperaba encontrar la interacción AKT-Mst3. No obstante, aunque se logró detectar perfectamente Mst3 y AKT en las balsas lipídicas mediante WB convencional, no se detectó mediante inmunoprecipitación a AKT en esta fracción celular. Esto parece deberse a que el anticuerpo primario de AKT usado para inmunoprecipitar en la fracción OCG-soluble no es capaz de unirse a su epitopo en las condiciones del tampón de lisis, no siendo posible reproducir lo encontrado por el grupo de Cinar. Si bien es cierto que no se ha incluido como control positivo la inmunoprecipitación de Mst1, siguiendo sus protocolos no se ha logrado inmunoprecipitar ni la quinasa AKT en las balsas lipídicas, y por tanto según estos resultados tampoco se puede descartar que AKT interaccione con Mst3.

A





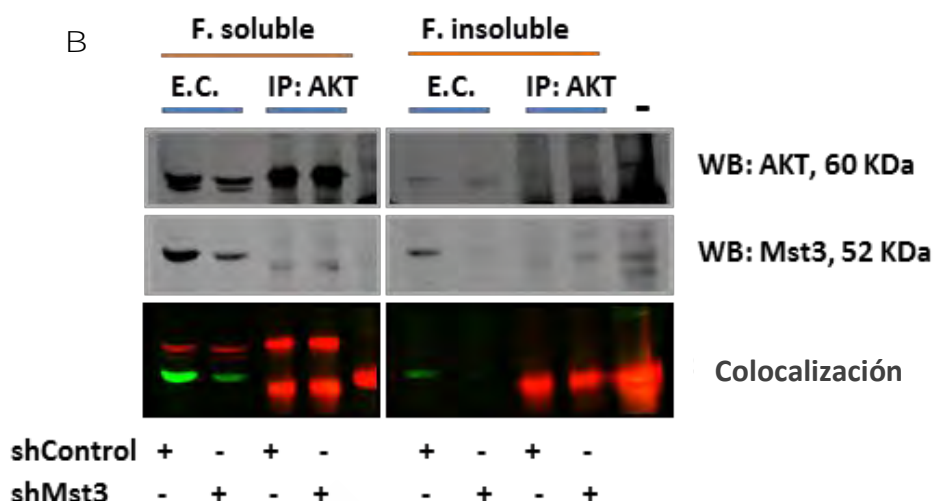


FIGURA 77. AKT no inmunoprecipita en la fracción insoluble correspondiente a las balsas lipídicas, no se puede detectar la interacción AKT-Mst3. Se recogieron extractos de células shControl y shMst3 tras la transfección en buffer A que extrae al sobrenadante la fracción soluble en Tritón X-100 y posteriormente se sometió al pellet a un nuevo buffer B que extrae la fracción insoluble o balsas lipídicas gracias al detergente *octylglucoside* (Solomon, Mallory et al. 1998). A. IP de Mst3 y WB para Mst3 y AKT. Se incubaron toda la noche 1,5 mg de ambas fracciones con anticuerpo anti-Mst3 y proteína G agarosa y posteriormente se detectaron tanto Mst3 como AKT mediante WB en extracto sin inmunoprecipitar (E.C.) o inmunoprecipitado (IP). Se incluye un control negativo de IP con proteína IgG. B. IP de AKT y WB para Mst3 y AKT. Se incubaron toda la noche 2 mg de fracción soluble y 4 mg de fracción insoluble con anticuerpo anti-AKT y proteína agarosa y posteriormente se detectó mediante WB fluorescente tanto AKT como Mst3 en E.C e IP. Se muestra un control negativo como en A. El WB fluorescente permite ver proteínas del mismo peso molecular o muy próximo al incubarse con anticuerpos secundarios con fluoróforos de distinto color cuando los primarios fueron generados en especies diferentes. Se muestra una colocalización del WB de AKT en rojo y de Mst3 en verde. Nótese que en el control negativo se detecta una banda muy intensa correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo usado para inmunoprecipitar (HA). (Los WB individuales para Mst3 y AKT se han convertido a escala de grises mediante el programa Image J para facilitar su visualización en la versión impresa de este manuscrito).

Para no descartar por completo la posibilidad de una interacción entre AKT y Mst3 por las complicaciones técnicas de la inmunoprecipitación de ambas proteínas en la fracción insoluble, se decidió llevar a cabo su sobreexpresión en un modelo celular fácilmente transfectable mediante el método de fosfato cálcico como son las células de riñón Hek293. Al sobreexpresar dos proteínas se facilita la detección de su interacción. Sin embargo, como se observa en la figura 78 tampoco se detecta interacción entre AKT y Mst3 en sobreexpresión.

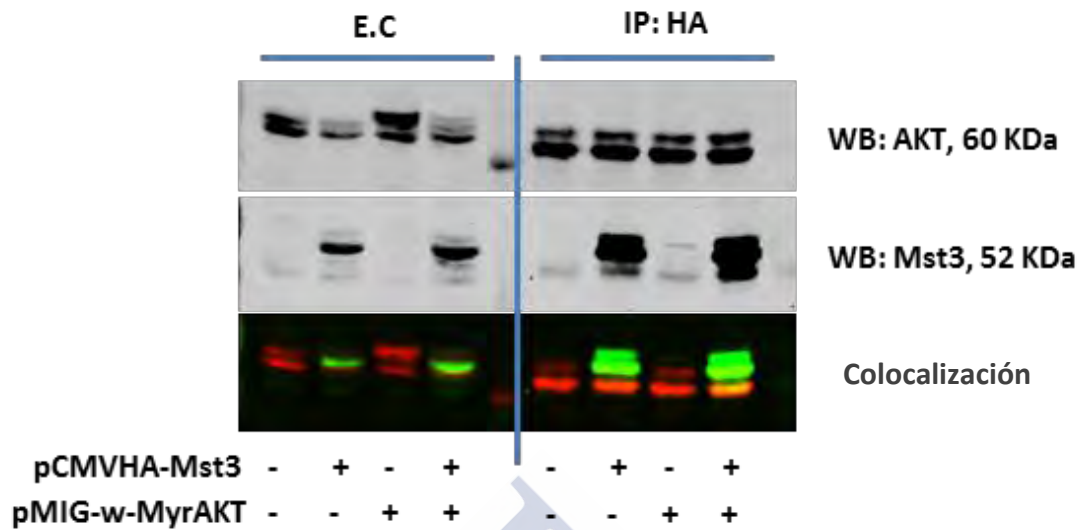


FIGURA 78. AKT no inmunoprecipita con Mst3 en extractos de células Hek293 cotransfectadas con ambas proteínas. Se transfectaron células Hek293 mediante fosfato cálcico con plásmidos de Mst3 y AKT. Se recogieron los extractos y se realizó una inmunoprecipitación de Mst3 con un anticuerpo frente a HA. Se detectaron AKT y Mst3 con sus respectivos anticuerpos mediante *Western Blot Fluorescente*. Se muestra una sobreposición del WB de AKT en rojo y de Mst3 en verde. Nótese que en el WB de AKT y Mst3 se detecta una doble banda en el control transfectado con plásmidos vacíos entre 50 y 60 KDa correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo usado para inmunoprecipitar. (Los WB individuales para Mst3 y AKT se han convertido a escala de grises mediante el programa Image J para facilitar su visualización en la versión impresa de este manuscrito).



# DISCUSIÓN



Las Ste20p se describieron por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* con función MAP4K. En mamíferos se encontraron unas 30 quinasas relacionadas con las Ste20 que se caracterizan por la presencia de un dominio catalítico bien conservado. Estas proteínas se han implicado en un amplio rango de respuestas biológicas, como la regulación de la proliferación y diferenciación celular, polaridad, reorganización del citoesqueleto y respuesta a estrés. Similar a lo que ocurre con sus homólogas en levadura, las Ste20 de mamíferos también pueden activar cascadas MAPK.

La familia de proteína quinasas GCK-III constituye una de las más estudiadas dentro de la superfamilia de las quinasas Ste20 de mamífero y fueron clasificadas como quinasas de estrés al encontrarse que pueden ser activadas por distintos tipos de estrés celular. Posteriormente se encontraron para ellas funciones relevantes en células no estresadas relacionadas con la regulación de la forma celular y del citoesqueleto. Más recientemente se ha visto que en diversos modelos de estrés metabólico la sobreexpresión de SOK1 participa en la alteración del metabolismo lipídico de músculo e hígado. La afectación del hígado y del músculo en estos modelos conlleva secundariamente a defectos en el manejo de la glucosa (Nerstedt, Cansby et al. 2012, Amrutkar, Kern et al. 2015). La eliminación génica de SOK1 en ratones protege frente a las consecuencias de la exposición a una dieta alta en grasas; evitando la acumulación lipídica en músculo y reduciendo la producción hepática de glucosa lo que correlaciona con una mejor tolerancia a glucosa sistémica y una mejor sensibilidad a insulina generalizada (Amrutkar, Cansby et al. 2015). La relación encontrada entre SOK1 y metabolismo en los modelos murinos se ha visto reforzada por los datos obtenidos en biopsias de hígados de pacientes diabéticos en los que hay una alta expresión de SOK1. Los mecanismos moleculares por los que SOK1 afecta a estos órganos están siendo objeto de estudio, las últimas publicaciones revelan la presencia de SOK1 en las gotas lipídicas e hipotetizan sobre la relación de esta asociación y el desarrollo de la enfermedad hepática NASH (Amrutkar, Chursa et al. 2016).

En este trabajo, se propone que otra de las GCK-III, Mst3, que demostramos se activa por una dieta alta en grasas, es relevante para el desarrollo de resistencia hepática a insulina, de la intolerancia a glucosa y de la hiperglucemia en ayunas inducida por este tipo de dietas.

En concreto se describe por primera vez como Mst3 regula la gluconeogénesis hepática. Teniendo en cuenta que la alteración de la regulación de la gluconeogénesis contribuye al desarrollo de la hiperglucemia en ayunas de los pacientes con diabetes tipo II nuestros datos amplían el conocimiento de las causas moleculares implicadas en la patogénesis de la DM2 y la resistencia a insulina y señalan a Mst3 como una proteína a ser considerada como diana terapéutica en el tratamiento de esta enfermedad. Nuestros experimentos se diseñaron con el fin de estudiar la relevancia de Mst3 en el metabolismo.

## 1. Utilización del modelo animal *Knockdown* (KD) de Mst3

El modelo animal utilizado consistió en un ratón transgénico generado mediante el sistema *gene trapping* por el cual un vector externo se inserta en el gen de Mst3 alterando el sistema de corte y empalme entre exones e intrones dando lugar a una proteína no funcional. Se trata de un modelo generado al azar y por tanto más simple y menos costoso que otros métodos comunes como los KO condicionales o tejido-específicos. A lo largo de esta tesis se ha visto que el modelo *gene trap* presentaba un fenómeno de *splicing around* muy marcado. Esto implica que el alelo de Mst3 mutado es hipomórfico y puede dar lugar a ratones con niveles variables de Mst3 funcional que no se pueden considerar ratones *knockout* (KO) verdaderos sino *knockdown* (KD). La forma en que se generó este modelo implica además que no se conozca el lugar exacto de inserción de la mutación dentro del gen de Mst3, por lo que el genotipado se hacía en un principio a partir del mRNA de Mst3 y utilizando cebadores que reconociesen la secuencia del vector incorporado al transcripto final. Con este método de genotipado y debido al *splicing around* se enmascaraban los ratones KD, que aparecían como falsos heterocigotos puesto que siempre se les amplificaba algo de Mst3 normal. Fue necesario diseñar un sistema para localizar con precisión el lugar de incorporación del vector dentro del gen de Mst3 y así poder genotipar con fiabilidad a los ratones detectando ya a nivel de su DNA genómico si habían incorporado la mutación. La cantidad de Mst3 funcional que puede llegar a producir cada ratón de este tipo es muy

variable, al menos en la cepa con fondo genético mixto usada en esta Tesis (ver más adelante). Por ello, fue necesario genotiparlos nuevamente tras el sacrificio para medirles en hígado los niveles de mRNA normal de Mst3 que eran capaces de producir, y así descartar a todos aquellos ratones KD que presentaran más de la mitad de Mst3 normal que los WT. Teniendo en cuenta que el número de ratones a descartar era una incógnita hasta su sacrificio, el principal obstáculo fue la necesidad de trabajar siempre con un exceso de animales. Más allá de ser considerado un inconveniente, se apostó por este modelo por el hecho de que si se observa un efecto incluso sin una inactivación completa del gen, (algunos ratones tenían niveles de Mst3 cercanos a la heterocigosis) esto hace más probable que una inhibición farmacológica sea eficaz en controlar la hiperglucemia en ayunas en el contexto de resistencia a insulina puesto que los fármacos nunca son capaces de eliminar por completo la actividad de una proteína. Además, la mayor parte de modelos murinos empleados hasta el momento para entender las enfermedades humanas se basan en la eliminación total del gen implicado. Una mutación real no siempre implica la desaparición por completo de la función génica, por tanto, el hecho de que los resultados de este trabajo presenten significación estadística cuando existe cierta expresión proteica, implica que el efecto regulatorio que ejerce Mst3 sobre la gluconeogénesis es relevante.

Otra de las características del modelo es el fondo genético en que se hicieron los estudios. Se trata de un fondo mixto entre las cepas 129sv y C57BL/6J y los ratones que se obtienen presentan un fenotipo muy distinto en cuanto a su pelaje, color de ojos e incluso tamaño y peso dentro de una misma camada. A la hora de realizar estudios metabólicos en los que se comparan los incrementos de peso, composición corporal y otras variables relacionadas, se obtiene una gran varianza intragrupo, haciendo más difícil obtener diferencias significativas, a pesar de que se utilizaron hermanos de camada en las comparaciones. Esto hace a los resultados más robustos. La mayoría de cepas empleadas en estudios metabólicos parten de ratones con fondo puro y con pesos muy similares entre sí a la misma edad. Al momento de hacer la translación a lo que ocurre en humanos y dado que no todos son homogéneos en cuanto a peso o composición corporal, las diferencias significativas en nuestro modelo se acercan más a la realidad (MONTAGUTELLI 2000). En este estudio se ha realizado el fenotipo metabólico tanto de machos como de hembras



aunque sólo se han obtenido diferencias significativas en los machos. Esto parece deberse a que las hembras presentaron mayor resistencia a la HFD y no han alcanzado diferencias significativas en sus glucosas basales en ayunas con respecto a las que presentaban cuando se alimentaron con dieta convencional. Por este motivo, el análisis de muestras y tejidos se realizó sólo para machos.

## 2. Activación de Mst3 con estrés metabólico

Mst3 se activa en hígado de ratones con obesidad inducida por una dieta alta en grasa, lo que se demuestra por un aumento en la fosforilación en su bucle de activación. Esta activación no se observa en animales alimentados con una dieta estándar lo que viene a corroborar que Mst3 es una quinasa que se activa fundamentalmente ante un estrés. En este caso lo novedoso es que también se puede activar *in vivo* por el estrés metabólico que supone la administración de una dieta con un alto contenido graso. Aunque en el caso de SOK1 el efecto de su sobreexpresión en ratones transgénicos puede llevar a alteraciones metabólicas incluso cuando se alimentan con dieta convencional, las diferencias son más pronunciadas cuando los animales se alimentan con HFD (Cansby, Amrutkar et al. 2013). El efecto de la HFD lleva a los ratones a un estado prediabético con resistencia a insulina sistémica que se intenta compensar mediante un exceso en la secreción de insulina. El tiempo de dieta necesario para que los ratones alcancen este estado es variable según la cepa y en este caso han sido necesarias 21 semanas de dieta grasa para conseguir que las glucosas basales en ayunas de ratones WT alimentados con dieta alta en grasa fuesen significativamente más altas que las de los alimentados con dieta convencional.

Aunque se conoce cómo actúa Mst3 como quinasa de estrés para responder a situaciones de estrés oxidativo en la que se generan ROS (Wu, Lin et al. 2011), se desconocía por completo su implicación en respuesta a estrés metabólico o su posible participación en la fisiopatología de la DM2. En este trabajo se muestra por primera vez su activación por estrés metabólico. Como se ha visto en la introducción de este trabajo, una teoría que trata

de explicar el desarrollo de resistencia a insulina y DM2 es la generación de estrés oxidativo y ROS debida a la glucolipotoxicidad que generan las cantidades excesivas de glucosa y lípidos en sangre y tejidos metabólicos (Tangvarasittichai 2015). Sabiendo que la administración de estas dietas altas en grasas pueden incrementar el estrés oxidativo y las ROS (Geetha, Sathiya Priya et al. 2016) y que Mst3 se activa en respuesta a ROS sería razonable pensar que la actuación de Mst3 en estrés metabólico sea secundaria al estrés oxidativo. Sin embargo, se necesitaría sustituir el modelo de células de hepatocarcinoma que se usó en este trabajo por un modelo con cultivos primarios de hepatocitos que nos permitiese llevar a cabo nuevos experimentos de medida de radicales libres o la realización de tratamientos con antioxidantes para poder arrojar luz sobre el papel de Mst3 en el desarrollo de la resistencia a insulina sin que estos resultados se vieses afectados por el metabolismo distinto que presentan las células cancerosas.

### **3. La acción de Mst3 es específica sobre la regulación de glucemia en ayunas**

Los resultados de este trabajo parecen indicar que la activación de Mst3 tras una dieta alta en grasas es importante en el desencadenamiento de la hiperglucemia en ayunas y de la resistencia a insulina inducida por HFD ya que ratones con bajos niveles de Mst3 no la desarrollan. Este efecto parece ser bastante específico porque no afecta a otros parámetros como la ganancia de peso corporal, el porcentaje de grasa corporal, ni a otros aspectos de la regulación metabólica como el gasto energético, actividad locomotora, o alguna otra de las determinaciones tomadas en las jaulas metabólicas. En la mayoría de modelos murinos en los que existe una protección contra la diabetes también muestran una protección frente a la obesidad puesto que la primera suele ser secundaria a la segunda. El hecho de que en este modelo deficiente en Mst3 se proteja frente a resistencia a insulina pero que no se afecte su capacidad de engordar hace pensar en dos posibilidades: (1) que el efecto de la falta de Mst3 sea muy específico sobre un único parámetro como es la gluconeogénesis; o (2) que el

modelo de ratón KD en el que se expresan ciertos niveles de Mst3 sumado a la variabilidad fenotípica del fondo mixto no sean condiciones favorables para ver diferencias significativas en cuanto al peso, que por otra parte sí presenta una tendencia a ser menor en ratones deficientes en Mst3 que también se acompaña de una menor ingesta cuando están en este estado prediabético.

También se hace evidente en la prueba GTT que el problema en el control de la glucosa surge cuando hay déficit de la misma, es decir, en ayunas, ya que al administrarle una dosis alta de glucosa intraperitonealmente, WT y KD son capaces de clarificarla de la sangre de igual forma, indicando que el transporte e internalización de glucosa a la célula se mantiene intacto en ambos genotipos. Si bien es cierto que siempre hay una tendencia a que la mayor parte de los demás parámetros metabólicos analizados sean menores en los KDs, no llega a ser estadísticamente significativo. Sería necesario un KO completo para ver si estos otros parámetros ganarían en diferencias con los WT, y si el efecto de Mst3 en metabolismo va más allá de la regulación de la glucemia en ayunas.

De forma relevante, en DM2, uno de los defectos que más tempranamente se desarrolla y mejor refleja la severidad de la enfermedad es la hiperglucemia en ayunas y se usa incluso como parámetro para diagnóstico clínico de una progresión hacia DM2 (Guo, Yu et al. 2016). A pesar de ello, la variedad de fármacos que existe para controlar este problema no ha evolucionado demasiado en los últimos años. Prácticamente solo la metformina (Foretz, xE et al. , Mackenzie and Elliott 2014) disminuye sobre todo la glucemia basal en ayunas pero ninguno de los fármacos modernos parece enfocado a ello sino más bien están enfocados a tratar la hiperglucemia postprandial. Por tanto, se necesita trabajar más en el desarrollo de dianas para el tratamiento de los niveles de glucosa durante el ayuno y en este trabajo se presenta a Mst3 como una buena opción para este control. Ante la posibilidad de que la activación de Mst3 fuera inhibible por metformina se encargó un estudio farmacológico *in vitro* donde se sometió a Mst3 recombinante a cantidades crecientes de metformina y en el que no se encontró capacidad de este fármaco para inhibir Mst3 directamente (no se muestran datos). No obstante, sería interesante repetir este experimento en un modelo

celular o incluso *in vivo* ante la posibilidad de que la metformina pudiera tener un efecto indirecto sobre la actividad Mst3.

#### 4. Mst3 regula la gluconeogénesis

Durante el desarrollo y curso de la DM2, la hiperglucemia en ayunas puede ser el resultado de un aumento en la producción hepática de glucosa tanto a partir de la rotura de glucógeno por glucogenolisis como a través de su síntesis *de novo* o gluconeogénesis, o debido a una disminución en su utilización y puede ir acompañada de resistencia a la acción de insulina y/o de un defecto en su secreción. En este trabajo se propone que los bajos niveles de Mst3 protegen a los animales prediabéticos de una excesiva producción de glucosa, específicamente de la gluconeogénesis, como sugiere la menor respuesta al precursor gluconeogénico piruvato en la prueba PTT y la inhibición de los genes gluconeogénicos en los ratones deficientes para Mst3, disminución que es significativa en el caso de la G6PC. Esto es consistente con el agotamiento descrito para las reservas de glucógeno tras un ayuno prolongado como el que se aplica en los experimentos descritos. Un ayuno nocturno de entre 14-18 horas provoca un estado catabólico en el ratón puesto que ellos consumen su alimento fundamentalmente por la noche. Se consumen en primer lugar las reservas de glucógeno para posteriormente pasar al suministro de glucosa a partir de gluconeogénesis entre las 12-16 horas, aunque los depósitos de glucógeno no se agotan por completo hasta las 48 horas de ayuno (Wahren and Ekberg 2007). Cuando se midieron las reservas de glucógeno remanentes en los hígados de los ratones sometidos a ayuno nocturno se encontró que estas eran significativamente menores en los KD. Esto puede ser porque existe un defecto en la síntesis de glucógeno, sin embargo, la falta de activación de la enzima GSK3 en células hepáticas deficientes en Mst3 indica que esta hipótesis no es la más plausible. A falta de comprobar los mismos resultados en cuanto a GSK3 en el propio modelo murino, otra posible hipótesis es que, ante un ayuno prolongado, las menores reservas de glucógeno en ausencia de Mst3 se debiesen al propio defecto en la gluconeogénesis, por lo

que los animales KD siguen agotando sus reservas de glucógeno mientras en los WT la síntesis *de novo* de glucosa funciona a pleno rendimiento. Harían falta más experimentos para corroborar que esta hipótesis es así, aunque todos nuestros resultados apuntan a que es la más acertada.

## 5. La deficiencia en Mst3 protege frente a la resistencia a insulina

La falta de Mst3 protege frente a la resistencia a insulina, tanto en ayunas, como se evidencia en el análisis HOMA-IR, como después de la administración de insulina exógena, como se ve en la prueba de ITT. Cuando se administra insulina intraperitonealmente, los ratones WT prediabéticos apenas son capaces de responder a la señal de esta hormona, mientras que los ratones KD sí son capaces de disminuir sus niveles de glucosa en sangre en respuesta a insulina. Esto concuerda con las diferencias encontradas en los niveles de insulina medidos tras un periodo de ayunas de 4 horas, los cuales son significativamente menores en ratones sin Mst3. Ante la falta de Mst3 los ratones responden mejor a insulina y presentan menores niveles en sangre y esto podría deberse a que su señalización es más eficiente que en los WT. La inmunoprecipitación del receptor de insulina en estos ratones revela que este receptor tiende a estar más fosforilado en los animales WT, probablemente reflejando su estado hiperinsulinémico.

La mejor respuesta a insulina de los ratones KD también puede estar relacionada con una menor acumulación de lípidos en el hígado como se observa para la determinación de triglicéridos en este órgano. La esteatosis o acumulación de lípidos en hígado en ausencia de ingesta de alcohol o NAFLD es la más común de las enfermedades crónicas y se produce cuando existe un desequilibrio entre el balance de la entrada de y la exportación de lípidos en hígado. En los pacientes con NAFLD, la resistencia a insulina conduce a la esteatosis hepática mediante diversos mecanismos que incluyen una mayor entrada de NEFAs procedentes del tejido adiposo hipertrofiado como consecuencia de la menor sensibilidad a insulina, y, al mismo tiempo el que la hiperinsulinemia induzca la sobreexpresión de genes

que promueven la lipogénesis *de novo* en el hígado, lo que además no se compensa con una mayor oxidación de ácidos grasos o una mayor salida en forma de lipoproteínas (Kawano and Cohen 2013, Ress and Kaser 2016). Por tanto, la menor resistencia a insulina que observamos en los ratones deficientes en Mst3 parece explicar el hecho de que estos acumulen menos triglicéridos en hígado. Además, en este resultado apreciamos que el efecto de la falta de Mst3 frente a la HFD parece bastante específico sobre hígado puesto que las diferencias en la acumulación de grasas las encontramos solamente en este órgano y no en el % de grasa corporal total. Sin embargo, cuando miramos los niveles de expresión de genes relacionados con la síntesis y transporte de ácidos como (*Fasn* y *Acc*) no encontramos diferencias significativas.

## **6. Modelo de células hepáticas en cultivo para estudiar el mecanismo molecular de regulación de Mst3 sobre enzimas gluconeogénicas**

Mst3 parece mediar sus efectos directa y fundamentalmente en células de hígado puesto que se encuentran efectos compatibles *in vivo* y en células de hígado en cultivo y también se observa la activación por fosforilación de Mst3 en su bucle de activación en hígados de ratones alimentados con HFD. Para poder probar esta hipótesis, sería también interesante analizar el estado de fosforilación de Mst3 en otros tejidos del ratón como el riñón que es el órgano capaz de realizar gluconeogénesis aparte del hígado. También sería necesario analizar la activación de Mst3 en otros órganos metabólicos no gluconeogénicos como el músculo e incluso el cerebro, donde se expresa la isoforma Mst3b y así valorar si la acción metabólica de Mst3 no es exclusiva sobre la gluconeogénesis.

Algunas de las principales ventajas de la utilización de cultivos celulares con respecto al modelo *in vivo* es su sencilla manipulación, rápido crecimiento, la versatilidad a la hora de realizar tratamientos y modificaciones de su genoma, mayor reproducibilidad de los experimentos y menor coste en la adquisición y mantenimiento. Por otra parte, la principal desventaja del cultivo celular es que se trata de un modelo de tejido aislado mientras que el



ratón constituye un sistema multitorgánico con una mejor translación a la fisiología humana. Aunque cabría la posibilidad de realizar cultivos primarios a partir del hígado de los propios ratones de fondo mixto tanto KD como WT, o incluso la posibilidad de extraer hígados de ratones de cepas puras y eliminarles la expresión de Mst3 mediante sistemas lentivirales o adenovirales, estos cultivos primarios tienen un número de divisiones limitadas y no permiten hacer una línea deficiente mediante shRNA de forma estable durante demasiado tiempo. Por ello y debido a la disponibilidad inmediata en el propio laboratorio, se eligió un modelo de línea celular de hepatocarcinoma de rápido crecimiento y fácilmente transfectable con lentivirus portadores de shRNAs para crear dos líneas estables shControl y shMst3. Las HepG2 son una línea ampliamente documentada en la bibliografía y muy utilizada para estudios de metabolismo. Se asumió también que este cultivo HepG2 podría ser un buen modelo para este trabajo ya que son células cancerosas con un metabolismo alejado de la normalidad lo que es en parte comparable al estrés metabólico de que sufren los ratones sometidos a HFD. Cuando se analizaron los niveles de mRNA de enzimas gluconeogénicas G6PC y PCK1 de estas células comparativamente con otro cultivo de células de hígado no cancerosas pero inmortalizadas (THLE-2) se observó que en las mismas condiciones de tiempo de cultivo y de reacción de PCR en tiempo real las THLE-2 no tenían niveles detectables de expresión de estas enzimas, mientras que las HepG2 amplificaban a ciclos relativamente tempranos (no se muestran los datos). Con unos buenos niveles de expresión de enzimas gluconeogénicos resultó sencillo comparar las líneas shControl y shMst3 en el hepatocarcinoma.

## **7. Mst3 regula la expresión de los promotores de enzimas gluconeogénicas**

Lo primero que se quiso comprobar en el modelo celular fue la posibilidad de que Mst3 estuviera regulando directamente a los promotores de enzimas gluconeogénicas G6PC y PCK1. Los experimentos de genes *reporter* con luciferasa revelaron que efectivamente la



falta de Mst3 reducía la actividad de los promotores gluconeogénicos y de forma significativa en la enzima G6PC y que esta actividad se recuperaba al introducir Mst3 exógeno a las células. Cabe la posibilidad de que la regulación de Mst3 sobre los promotores sea directa, ya que esta kinasa, al menos en su forma cortada, puede entrar al núcleo. Para comprobarlo sería necesaria la realización de experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

## 8. Mst3 regula la vía de AKT/insulina.

En células hepáticas, la deficiencia de Mst3 tiene como consecuencia la fosforilación de AKT tanto en Ser473 como en Thr308 y la activación de la vía de mTORC2 lo que se refleja como una mayor fosforilación en Thr346 de pNDRG1 (un sustrato de SGK1 que es considerado como un excelente biomarcador de la actividad de mTORC2) (Garc and Alessi 2008) con respecto a células normales. Como consecuencia última de la falta de Mst3 y la sobreactivación de mTORC2 y AKT, se produce también una mayor fosforilación del factor de transcripción FOXO1 lo que provoca su salida del núcleo y que por tanto no pueda llevar a cabo su papel sobre la transcripción de enzimas gluconeogénicas, lo que explicaría el por qué en las células shMst3 se produce una inhibición de la expresión de estas enzimas. La activación de este eje mTORC2/AKT también se produce en nuestro modelo de ratón deficiente en Mst3, en condiciones de baja insulina, lo que sería también compatible con los datos obtenidos de una menor producción de glucosa en ayunas.

El efecto de Mst3 sobre la señalización de la vía de AKT parece encontrarse a nivel de regulación de PI3K o *downstream* puesto que al inhibir esta quinasa se induce la respuesta de G6PC y PCK1 aunque en menor medida en células sin Mst3. Además, no se encuentran diferencias en los niveles de fosforilación en tirosina de IRS1, el enzima *upstream* PI3K, en presencia o ausencia de Mst3. El análisis de los hígados de ratones sometidos a HFD apunta a la misma conclusión, al encontrarse mayor fosforilación de NDRG1 y AKT en ratones KD. De forma importante, un efecto a este nivel de la ruta de respuesta a insulina es compatible con la resistencia a insulina selectiva (efectos de la insulina sobre la glucosa pero no sobre

lípidos), característica en las células de hígado (Taniguchi, Emanuelli et al. 2006, Semple, Sleight et al. 2009). No obstante, la sobreactivación por fosforilación encontrada para NDRG1/AKT/FOXO1 en ausencia de Mst3 se produce cuando las células se encuentran con bajos niveles de insulina tras permanecer 72 horas en cultivo y en el caso de los ratones cuando estos están en ayunas, y por tanto con poca insulina. Al tratar las HepG2 con un exceso de insulina toda la vía de respuesta se sobreactiva por fosforilación pero las diferencias entre células shControl y shMst3 desaparecen remarcando de nuevo la especificidad de actuación de Mst3 sobre la gluconeogénesis (que sólo puede tener lugar en condiciones de baja insulina) y su importancia para la regulación de la IFG.

Se ha visto en la introducción de este trabajo que además de la regulación que ejercen los niveles de insulina sobre la gluconeogénesis, en situación de ayunas el glucagón y cortisol constituyen otro de los grandes ejes reguladores de la transcripción de genes gluconeogénicos, promoviendo su expresión a través de la señalización del AMPc y el enzima PKA. Los resultados de este trabajo muestran que Mst3 es importante no solo para la regulación de genes gluconeogénicos en condiciones de baja insulina, sino también en respuesta a AMPc puesto que células shMst3 tratadas con un análogo de este segundo mensajero tienen significativamente menor expresión de G6PC que las shControl. Además, se trata de un defecto en la señalización a nivel transcripcional pero no sobre la vía general de PKA puesto que los niveles de su sustrato CREB fosforilado no varían en presencia o ausencia de Mst3. Serían necesarios nuevos experimentos para tratar de resolver por qué ante la falta de Mst3 G6PC no responde a AMPc en la misma medida que en células normales y si simplemente es un efecto secundario a los efectos sobre la vía de AKT.

Se analizó la posibilidad de que Mst3 regulara a AKT por interacción directa basándonos en resultados previos encontrados para la interacción con AKT de la quinasa de la misma subfamilia Mst1 y de parecido estructural con Mst3, las cuales interaccionan para llevar a cabo acciones pro-apoptóticas o anti-apoptóticas (Jang, Yang et al. 2007, Radu and Chernoff 2009). Dado el parecido del dominio catalítico de Mst1 y Mst3 y que este dominio es la parte de Mst1 que se ha descrito que interacciona con AKT en balsas lipídicas (Cinar, Fang et al. 2007), se aislaron dichos compartimentos para detectar una posible coinmunoprecipitación

de AKT y Mst3. No fue posible detectar la interacción entre Mst3 y AKT. Se detectaron ambas proteínas por separado y por *Western Blot* en las balsas lipídicas pero todo parece indicar que usando las mismas condiciones de inmunoprecipitación que el grupo de Cinar, el anticuerpo usado para la detección de AKT no ha logrado inmunoprecipitarla en las condiciones descritas. Cuando se intentó coinmunoprecipitar ambas proteínas en sobreexpresión en células Hek293 tampoco se detectó interacción. Por tanto aunque es evidente que Mst3 tiene un efecto sobre la fosforilación de AKT, en este trabajo no se puede concluir que sea por interacción directa.

Para afirmar que el efecto de Mst3 es bastante específico sobre la vía de insulina y concretamente sobre mTORC2/AKT/FOXO1 se analizaron también en HepG2 por *Western Blot* otras fosfoproteínas muy relacionadas con la regulación del metabolismo como AMPK o ERK1 sin obtener diferencias en cuanto a la presencia o ausencia de Mst3. Esto no resulta sorprendente puesto que en la literatura se describe que ni Mst3 ni SOK1 parecen activar vías MAPK como ERK, p38 o JNK, salvo para la isoforma Mst3b de cerebro que puede activar a ERK1/2 (Pombo, Force et al. 2007, Ling, Lu et al. 2008). Sin embargo, artículos posteriores describieron que Mst3 es capaz de mediar la muerte celular inducida por estrés oxidativo mediante la modulación de la activación de JNK (Wu, Lin et al. 2008, Chen, Ng et al. 2009, Wu, Lin et al. 2011) haciendo interesante la pregunta de si Mst3 es capaz de modular a JNK bajo un estrés metabólico como el inducido mediante la administración en ratones de una dieta HFD. La enzima JNK es crucial en el inicio de la resistencia a la insulina y es un importante regulador en la inflamación que se genera como consecuencia de la obesidad. Se sabe que SOK1 se activa por fosforilación en células de músculo tanto por estrés inflamatorio como oxidativo (Nerstedt, Cansby et al. 2012) por lo que sería interesante analizar en los ratones KD Mst3 el estado de fosforilación de JNK. También el tratamiento de células primarias con citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  o IL-6 para posteriormente analizar el estado de fosforilación de Mst3 podría ayudar a conocer más aspectos de la función regulatoria de Mst3 en metabolismo.

Futuros experimentos para tratar de situar la acción de Mst3 sobre el eje mTORC2/AKT/FOXO1 se basarían en la inhibición farmacológica de mTOR. Por un lado se

sabe que AKT, el principal efector de PI3K se activa por el complejo sensible a rapamicina mTORC1, mientras que el otro complejo del que forma parte mTOR, mTORC2 (insensible a rapamicina) puede fosforilar directa e indirectamente a AKT en sus dos sitios de fosforilación (directamente sobre Ser473 e indirectamente a través de la activación de PDK1 que fosforila a AKT en Thr308) (Guertin, Stevens et al. 2006). mTORC2 es inhibible por inhibidores de mTOR de segunda generación como TORIN1 (Guertin and Sabatini 2009). El tratamiento de células normales o deficientes para Mst3 con los inhibidores rapamicina y TORIN1 para analizar los niveles de expresión de G6PC y PCK1 podría aportar nueva información acerca del papel de Mst3 en esta vía.

## 9. Mst3 como posible diana terapéutica

En este trabajo, se ha identificado a Mst3 como un mediador de defectos metabólicos en el contexto de resistencia a insulina. Esto abre nuevas ventanas al conocimiento de la señalización de la insulina en obesidad y propicia la investigación en un campo tan relevante como este. Además, su mayor importancia radica en el potencial de Mst3 como nueva diana en el tratamiento de la resistencia a la insulina y de la hiperglucemia en ayunas. Otra de las GCK-III, SOK1, se ha relacionado con resistencia a insulina ejerciendo su efecto principalmente sobre la regulación de lípidos en hígado y músculo. Debido a sus efectos en la inhibición de la oxidación lipídica, la inhibición de SOK1 ha sido propuesta también como diana terapéutica beneficiosa para combatir la resistencia a insulina (Amrutkar, Cansby et al. 2015). Según lo publicado por estos autores, la acción metabólica de SOK1 se limita a su actuación sobre la regulación lipídica y las consecuencias de su activación sobre la regulación de la glucosa son secundarias a sus efectos en lípidos (Amrutkar, Kern et al. 2015).

En este trabajo se propone que Mst3 sí presenta efectos específicos y directos sobre la regulación de la glucosa y por tanto los efectos de un fármaco que disminuya los niveles de glucosa a base de inhibir Mst3 podría tener una mayor eficacia por su actuación directa sobre la glucosa y sus posibles efectos colaterales sobre SOK1, cuyo dominio catalítico

presenta elevada homología con Mst3. Esta estrategia de tratamiento estaría basada en la inhibición al mismo tiempo de la hiperglucemia en ayunas y de la acumulación de lípidos en hígado, ambos propuestos como causa y efecto de la resistencia a insulina. El estudio del efecto individual de estas quinasas sobre la regulación metabólica a base de eliminar su expresión o función podría estar enmascarado por sus funciones equivalentes y por el efecto de compensación que pudiera ejercer una cuando faltase la otra. En este sentido, más que el estudio de un ratón *Knockout* específico para cada de ellas sería interesante la realización de un doble *knockout* de SOK1 y Mst3, y sobre todo dirigido a órganos metabólicos como hígado y músculo. La idea de un tratamiento bivalente para disminuir los efectos de Mst3 y SOK1 es bastante preliminar y requiere de un mayor estudio en relación al desarrollo de la diabetes y las quinasas GCK-III, que son por el momento participantes emergentes en la compleja patofisiología de la resistencia a insulina y DM2.

## 10. Resumen de los efectos metabólicos de Mst3

En resumen, en este trabajo se ha identificado a Mst3/STK24 como una quinasa que se activa por una dieta alta en grasas e influencia la resistencia a insulina y la intolerancia a glucosa en ayunas o hiperglucemia en ayunas después de dicha dieta. Mst3 inhibe la señalización de insulina a través del eje mTORC2/AKT/FOXO1 y estimula la expresión de los genes gluconeogénicos. Un tratamiento dirigido a inhibir la acción metabólica de Mst3 mejoraría el pronóstico de la DM2 a través de la disminución de los niveles de glucosa en ayunas y una menor resistencia a insulina (figura 79).

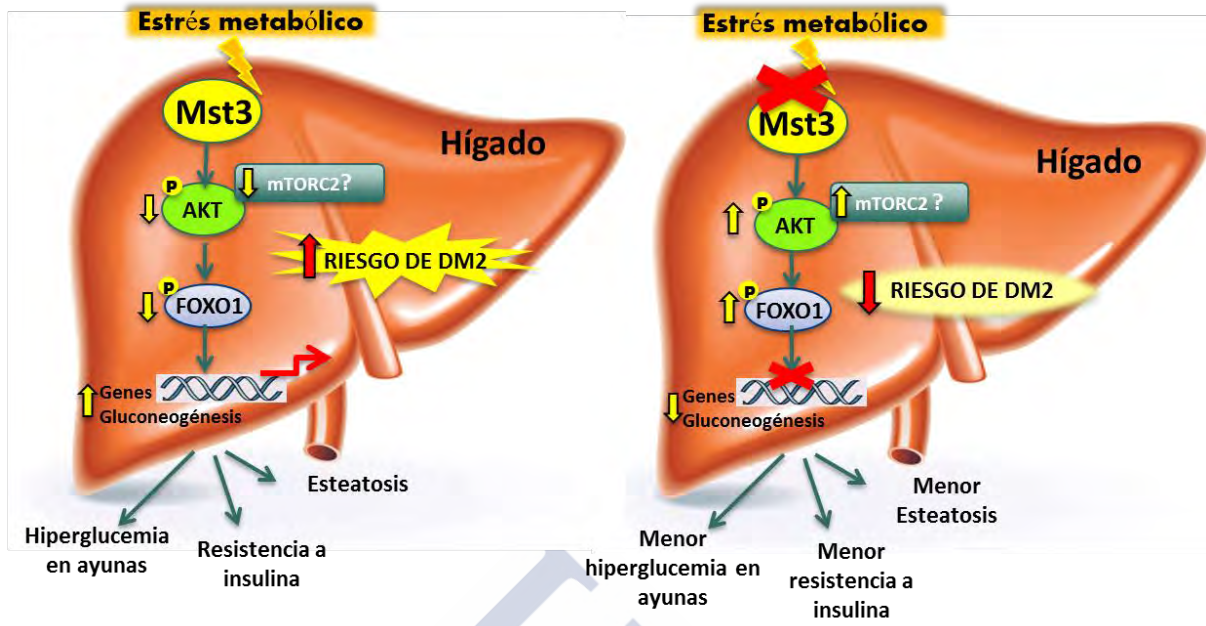
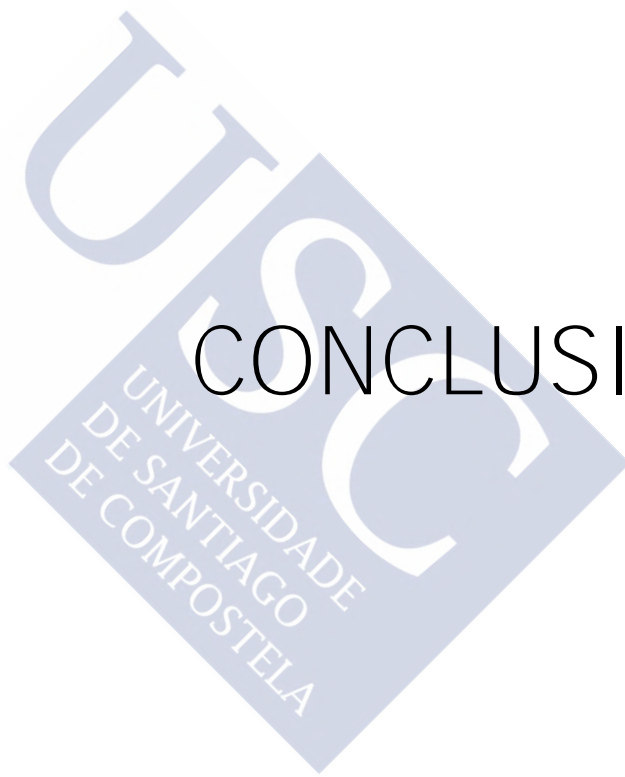


Figura 79. Modelo que se propone para explicar los efectos metabólicos de Mst3 y su posible actuación como diana terapéutica para combatir el estrés metabólico y reducir el riesgo de DM2.



# CONCLUSIONES







- 1) Se ha obtenido un modelo *in vitro* de células de hígado con niveles reducidos de Mst3 y Mst4 para el estudio de sus efectos metabólicos.
- 2) El modelo *in vivo* consistente en ratones deficientes para Mst3 presenta un alelo hipomórfico y genera niveles variables de proteína Mst3 funcional.
- 3) La administración de una dieta alta en grasa induce la activación de Mst3 y SOK1.
- 4) Mst3 es importante para el desarrollo de hiperglucemia en ayunas, de resistencia a insulina y de esteatosis hepática inducidas por una dieta alta en grasa.
- 5) La falta de Mst3 inhibe la gluconeogénesis y la expresión de G6PC y PCK1.
- 6) Mst3 ejerce sus acciones metabólicas sobre el metabolismo de la glucosa a través de la regulación de la vía de la insulina a nivel de su proteína central AKT aunque no se detecta interacción directa entre Mst3 y AKT.
- 7) Mst3 se presenta como una nueva diana terapéutica para el tratamiento de la resistencia a insulina y para la intolerancia a glucosa en ayunas.



# BIBLIOGRAFÍA





- Adams, D. J. and L. van der Weyden (2008). "Contemporary approaches for modifying the mouse genome." Physiological Genomics **34**(3): 225-238.
- Altarejos, J. Y. and M. Montminy (2011). "CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals." Nature reviews. Molecular cell biology **12**(3): 141-151.
- Amrutkar, M., E. Cansby, U. Chursa, E. Nuñez-Durán, B. Chancón, M. Ståhlman, V. Fridén, L. Mannerås-Holm, A. Wickman, U. Smith, F. Bäckhed, J. Borén, B. W. Howell and M. Mahlapuu (2015). "Genetic Disruption of Protein Kinase STK25 Ameliorates Metabolic Defects in a Diet-Induced Type 2 Diabetes Model." Diabetes **64**(8): 2791-2804.
- Amrutkar, M., U. Chursa, M. Kern, E. Nunez-Duran, M. Stahlman, S. Sutt, J. Boren, B. R. Johansson, H. U. Marschall, M. Bluher and M. Mahlapuu (2016). "STK25 is a critical determinant in nonalcoholic steatohepatitis." Faseb j **30**(10): 3628-3643.
- Amrutkar, M., M. Kern, E. Nuñez-Durán, M. Ståhlman, E. Cansby, U. Chursa, E. Stenfeldt, J. Borén, M. Blüher and M. Mahlapuu (2015). "Protein kinase STK25 controls lipid partitioning in hepatocytes and correlates with liver fat content in humans." Diabetologia **59**(2): 341-353.
- Arch, J. R. S., D. Hislop, S. J. Y. Wang and J. R. Speakman (2006). "Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals." Int J Obes **30**(9): 1322-1331.
- Association, A. D. (2015, 09/06/2015). "Diagnosing Diabetes and Learning About Prediabetes." from <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diagnosis/?loc=db-slabnav>.
- Bagrodia, S. and R. A. Cerione (1999). "Pak to the future." Trends Cell Biol **9**(9): 350-355.
- Barthel, A. and D. Schmolli (2003). "Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis." American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism **285**(4): E685-E692.
- Bergman, R. N. and M. Ader (2000). "Free Fatty Acids and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus." Trends in Endocrinology & Metabolism **11**(9): 351-356.
- Bezair, V., A. Mairal, R. Anesia, C. Lefort and D. Langin (2009). "Chronic TNF $\alpha$  and cAMP pre-treatment of human adipocytes alter HSL, ATGL and perilipin to regulate basal and stimulated lipolysis." FEBS Lett **583**(18): 3045-3049.
- Boj, Sylvia F., Johan H. van Es, M. Huch, Vivian S. W. Li, A. José, P. Hatzis, M. Mokry, A. Haegebarth, M. van den Born, P. Chambon, P. Voshol, Y. Dor, E. Cuppen, C. Fillat and H. Clevers (2012). "Diabetes Risk Gene and Wnt Effector Tcf7l2/TCF4 Controls Hepatic Response to Perinatal and Adult Metabolic Demand." Cell **151**(7): 1595-1607.

- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." Cell **96**(6): 857-868.
- Cansby, E., M. Amrutkar, L. Mannerås Holm, A. Nerstedt, A. Reyahi, E. Stenfeldt, J. Borén, P. Carlsson, U. Smith, J. R. Zierath and M. Mahlapuu (2013). "Increased expression of STK25 leads to impaired glucose utilization and insulin sensitivity in mice challenged with a high-fat diet." The FASEB Journal **27**(9): 3660-3671.
- Ceccarelli, D. F., R. C. Laister, V. K. Mulligan, M. J. Kean, M. Goudreault, I. C. Scott, W. B. Derry, A. Chakrabartty, A.-C. Gingras and F. Sicheri (2011). "CCM3/PDCD10 Heterodimerizes with Germinal Center Kinase III (GCKIII) Proteins Using a Mechanism Analogous to CCM3 Homodimerization." Journal of Biological Chemistry **286**(28): 25056-25064.
- Cinar, B., P.-K. Fang, M. Lutchman, D. Di Vizio, R. M. Adam, N. Pavlova, M. A. Rubin, P. C. Yelick and M. R. Freeman (2007). "The pro-apoptotic kinase Mst1 and its caspase cleavage products are direct inhibitors of Akt1." The EMBO Journal **26**(21): 4523-4534.
- Chen, C.-B., Jowin K. W. Ng, P.-H. Choo, W. Wu and Alan G. Porter (2009). "Mammalian sterile 20-like kinase 3 (MST3) mediates oxidative-stress-induced cell death by modulating JNK activation." Bioscience Reports **29**(6): 405.
- Chen, C.-Y. A., N. Ezzeddine and A.-B. Shyu (2008). "Messenger RNA Half-Life Measurements in Mammalian Cells." Methods in enzymology **448**: 335-357.
- Dan, I., N. M. Watanabe and A. Kusumi (2001). "The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades." Trends Cell Biol **11**(5): 220-230.
- Diabetes Teaching Center at the University of California, S. F. (2007). "El hígado y el azúcar en sangre." Retrieved 19/07/2016, 2016, from <https://dtc.ucsf.edu/es/tipos-de-diabetes/diabetes-tipo-2/compreension-de-la-diabetes-tipo-2/como-procesa-el-azucar-el-cuerpo/el-higado-y-el-azucar-en-sangre/>.
- Eriksson, J. W. (2007). "Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation – A hypothetical common pathway causing insulin resistance." FEBS Letters **581**(19): 3734-3742.
- Evans, J. L., I. D. Goldfine, B. A. Maddux and G. M. Grodsky (2002). "Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes." Endocrine Reviews **23**(5): 599-622.
- Fabbrini, E., F. Magkos, B. S. Mohammed, T. Pietka, N. A. Abumrad, B. W. Patterson, A. Okunade and S. Klein (2009). "Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(36): 15430-15435.
- Fabbrini, E., R. A. Tamboli, F. Magkos, P. A. Marks, A. W. Eckhauser, W. O. Richards, S. Klein and N. N. Abumrad (2010). "Surgical removal of omental fat does not improve insulin



- sensitivity and cardiovascular risk factors in obese adults." *Gastroenterology* **139**(2): 448-455.
- Fidalgo, M., M. Fraile, A. Pires, T. Force, C. Pombo and J. Zalvide (2010). "CCM3/PDCD10 stabilizes GCKIII proteins to promote Golgi assembly and cell orientation." *Journal of Cell Science* **123**(8): 1274-1284.
- Fidalgo, M., A. Guerrero, M. Fraile, C. Iglesias, C. M. Pombo and J. Zalvide (2012). "Adaptor Protein Cerebral Cavernous Malformation 3 (CCM3) Mediates Phosphorylation of the Cytoskeletal Proteins Ezrin/Radixin/Moesin by Mammalian Ste20-4 to Protect Cells from Oxidative Stress." *Journal of Biological Chemistry* **287**(14): 11556-11565.
- Filippi, B. M., P. de los Heros, Y. Mehellou, I. Navratilova, R. Gourlay, M. Deak, L. Plater, R. Toth, E. Zegiraj and D. R. Alessi (2011). "MO25 is a master regulator of SPAK/OSR1 and MST3/MST4/YSK1 protein kinases." *The EMBO Journal* **30**(9): 1730-1741.
- Foretz, M., xE, S. brard, J. Leclerc, E. Zarrinpashneh, M. Soty, G. Mithieux, K. Sakamoto, F. Andreelli and B. Viollet "Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state." *The Journal of Clinical Investigation* **120**(7): 2355-2369.
- Franco, F., C. Domenico, F. Paolo, D. Alberto, P. Ana, G. Andrea, P. Carla and M. Giovanna (2011). "The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus Micro- and Macrovascular Complications: Avenues for a Mechanistic-Based Therapeutic Approach." *Current Diabetes Reviews* **7**(5): 313-324.
- Frayn, K. N. and P. F. Maycock (1980). "Skeletal muscle triacylglycerol in the rat: methods for sampling and measurement, and studies of biological variability." *Journal of Lipid Research* **21**(1): 139-144.
- Fuchsberger, C., J. Flannick, T. M. Teslovich, A. Mahajan, V. Agarwala, K. J. Gaulton, C. Ma, P. Fontanillas, L. Moutsianas, D. J. McCarthy, M. A. Rivas, J. R. B. Perry, X. Sim, T. W. Blackwell, N. R. Robertson, N. W. Rayner, P. Cingolani, A. E. Locke, J. F. Tajes, H. M. Highland, J. Dupuis, P. S. Chines, C. M. Lindgren, C. Hartl, A. U. Jackson, H. Chen, J. R. Huyghe, M. van de Bunt, R. D. Pearson, A. Kumar, M. Müller-Nurasyid, N. Grarup, H. M. Stringham, E. R. Gamazon, J. Lee, Y. Chen, R. A. Scott, J. E. Below, P. Chen, J. Huang, M. J. Go, M. L. Stitzel, D. Pasko, S. C. J. Parker, T. V. Varga, T. Green, N. L. Beer, A. G. Day-Williams, T. Ferreira, T. Fingerlin, M. Horikoshi, C. Hu, I. Huh, M. K. Ikram, B.-J. Kim, Y. Kim, Y. J. Kim, M.-S. Kwon, J. Lee, S. Lee, K.-H. Lin, T. J. Maxwell, Y. Nagai, X. Wang, R. P. Welch, J. Yoon, W. Zhang, N. Barzilai, B. F. Voight, B.-G. Han, C. P. Jenkinson, T. Kuulasmaa, J. Kuusisto, A. Manning, M. C. Y. Ng, N. D. Palmer, B. Balkau, A. Stančáková, H. E. Abboud, H. Boeing, V. Giedraitis, D. Prabhakaran, O. Gottesman, J. Scott, J. Carey, P. Kwan, G. Grant, J. D. Smith, B. M. Neale, S. Purcell, A. S. Butterworth, J. M. M. Howson, H. M. Lee, Y. Lu, S.-H. Kwak, W. Zhao, J. Danesh, V. K. L. Lam, K. S. Park, D. Saleheen, W. Y. So, C. H. T. Tam, U. Afzal, D. Aguilar, R. Arya, T. Aung, E. Chan, C. Navarro, C.-Y. Cheng, D. Palli, A. Correa, J. E. Curran, D. Rybin, V. S. Farook, S. P. Fowler, B. I. Freedman, M. Griswold, D. E. Hale, P. J. Hicks, C.-C. Khor, S. Kumar, B. Lehne, D. Thuillier, W. Y. Lim, J. Liu, Y. T. van der Schouw, M. Loh, S. K. Musani, S. Puppala, W. R.

- Scott, L. Yengo, S.-T. Tan, H. A. Taylor Jr, F. Thameem, G. Wilson, T. Y. Wong, P. R. Njølstad, J. C. Levy, M. Mangino, L. L. Bonnycastle, T. Schwarzmayr, J. Fadista, G. L. Surdulescu, C. Herder, C. J. Groves, T. Wieland, J. Bork-Jensen, I. Brandslund, C. Christensen, H. A. Koistinen, A. S. F. Doney, L. Kinnunen, T. Esko, A. J. Farmer, L. Hakaste, D. Hodgkiss, J. Kravic, V. Lyssenko, M. Hollensted, M. E. Jørgensen, T. Jørgensen, C. Ladvall, J. M. Justesen, A. Käräjämäki, J. Kriebel, W. Rathmann, L. Lannfelt, T. Lauritzen, N. Narisu, A. Linneberg, O. Melander, L. Milani, M. Neville, M. Orho-Melander, L. Qi, Q. Qi, M. Roden, O. Rolandsson, A. Swift, A. H. Rosengren, K. Stirrups, A. R. Wood, E. Mihailov, C. Blancher, M. O. Carneiro, J. Maguire, R. Poplin, K. Shakir, T. Fennell, M. DePristo, M. Hrabé de Angelis, P. Deloukas, A. P. Gjesing, G. Jun, P. Nilsson, J. Murphy, R. Onofrio, B. Thorand, T. Hansen, C. Meisinger, F. B. Hu, B. Isomaa, F. Karpe, L. Liang, A. Peters, C. Huth, S. P. O'Rahilly, C. N. A. Palmer, O. Pedersen, R. Rauramaa, J. Tuomilehto, V. Salomaa, R. M. Watanabe, A.-C. Syvänen, R. N. Bergman, D. Bharadwaj, E. P. Bottinger, Y. S. Cho, G. R. Chandak, J. C. N. Chan, K. S. Chia, M. J. Daly, S. B. Ebrahim, C. Langenberg, P. Elliott, K. A. Jablonski, D. M. Lehman, W. Jia, R. C. W. Ma, T. I. Pollin, M. Sandhu, N. Tandon, P. Froguel, I. Barroso, Y. Y. Teo, E. Zeggini, R. J. F. Loos, K. S. Small, J. S. Ried, R. A. DeFronzo, H. Grallert, B. Glaser, A. Metspalu, N. J. Wareham, M. Walker, E. Banks, C. Gieger, E. Ingelsson, H. K. Im, T. Illig, P. W. Franks, G. Buck, J. Trakalo, D. Buck, I. Prokopenko, R. Mägi, L. Lind, Y. Farjoun, K. R. Owen, A. L. Gloyn, K. Strauch, T. Tuomi, J. S. Kooner, J.-Y. Lee, T. Park, P. Donnelly, A. D. Morris, A. T. Hattersley, D. W. Bowden, F. S. Collins, G. Atzmon, J. C. Chambers, T. D. Spector, M. Laakso, T. M. Strom, G. I. Bell, J. Blangero, R. Duggirala, E. S. Tai, G. McVean, C. L. Hanis, J. G. Wilson, M. Seielstad, T. M. Frayling, J. B. Meigs, N. J. Cox, R. Sladek, E. S. Lander, S. Gabriel, N. P. Burt, K. L. Mohlke, T. Meitinger, L. Groop, G. Abecasis, J. C. Florez, L. J. Scott, A. P. Morris, H. M. Kang, M. Boehnke, D. Altshuler and M. I. McCarthy (2016). "The genetic architecture of type 2 diabetes." *Nature* **536**(7614): 41-47.
- Fuller, Stephen J., Liam J. McGuffin, Andrew K. Marshall, A. Giraldo, S. Pikkariainen, A. Clerk and Peter H. Sugden (2012). "A novel non-canonical mechanism of regulation of MST3 (mammalian Sterile20-related kinase 3)." *Biochemical Journal* **442**(Pt 3): 595-610.
- Garc, J. M. and D. R. Alessi (2008). "activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1)." **385**: 375-385.
- Geetha, R., C. Sathya Priya and C. V. Anuradha (2016). "Trolox attenuates diet- induced oxidative stress, impairment of mitochondrial biogenesis and respiratory chain complexes in mice heart." *Clin Exp Pharmacol Physiol*.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5." *Journal of General Virology* **36**(1): 59-72.
- Graves, J. D., Y. Gotoh, K. E. Draves, D. Ambrose, D. K. Han, M. Wright, J. Chernoff, E. A. Clark and E. G. Krebs (1998). "Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1." *The EMBO Journal* **17**(8): 2224-2234.

- Guertin, D. A. and D. M. Sabatini (2009). "The pharmacology of mTOR inhibition." Sci Signal **2**(67): pe24.
- Guertin, D. A., D. M. Stevens, C. C. Thoreen, A. A. Burds, N. Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K. J. Fitzgerald and D. M. Sabatini (2006). "Ablation in Mice of the mTORC Components raptor , rictor , or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC  $\alpha$  , but Not S6K1." **2**: 859-871.
- Guo, V. Y., E. Y. Yu, C. Wong, R. W. Sit, J. H. Wang, S. Y. Ho and C. L. Lam (2016). "Validation of a nomogram for predicting regression from impaired fasting glucose to normoglycaemia to facilitate clinical decision making." Fam Pract **33**(4): 401-407.
- Harding, H. P., H. Zeng, Y. Zhang, R. Jungries, P. Chung, H. Plesken, D. D. Sabatini and D. Ron (2001). "Diabetes Mellitus and Exocrine Pancreatic Dysfunction in Perk $^{-/-}$  Mice Reveals a Role for Translational Control in Secretory Cell Survival." Molecular Cell **7**(6): 1153-1163.
- Harlow, E. and D. Lane (1988). Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill and B. M. Spiegelman (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.
- Hwang, E., K.-S. Ryu, K. Pääkkönen, P. Güntert, H.-K. Cheong, D.-S. Lim, J.-O. Lee, Y. H. Jeon and C. Cheong (2007). "Structural insight into dimeric interaction of the SARAH domains from Mst1 and RASSF family proteins in the apoptosis pathway." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(22): 9236-9241.
- IDF. (2015). "IDF Diabetes Atlas-7th Edition." Retrieved 21/04/2016, from <http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>.
- Itani, S. I., N. B. Ruderman, F. Schmieder and G. Boden (2002). "Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB- $\alpha$ ." Diabetes **51**(7): 2005-2011.
- Jang, S.-W., S.-J. Yang, S. Srinivasan and K. Ye (2007). "Akt Phosphorylates Mst1 and Prevents Its Proteolytic Activation, Blocking FOXO3 Phosphorylation and Nuclear Translocation." Journal of Biological Chemistry **282**(42): 30836-30844.
- Jin, W. and M.-E. Patti (2009). "Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes." Clinical Science **116**(2): 99-111.
- Johnson, A. M. and J. M. Olefsky (2013). "The origins and drivers of insulin resistance." Cell **152**(4): 673-684.
- Kahn, S. E., R. L. Hull and K. M. Utzschneider (2006). "Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes." Nature **444**(7121): 840-846.

- Karasu, Ç. (2010). "Glycoxidative Stress and Cardiovascular Complications in Experimentally-Induced Diabetes: Effects of Antioxidant Treatment." The Open Cardiovascular Medicine Journal **4**: 240-256.
- Katz, P., G. Whalen and J. H. Kehrl (1994). "Differential expression of a novel protein kinase in human B lymphocytes. Preferential localization in the germinal center." Journal of Biological Chemistry **269**(24): 16802-16809.
- Kawano, Y. and D. E. Cohen (2013). "Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease." J Gastroenterol **48**(4): 434-441.
- Kean, M. J., D. F. Ceccarelli, M. Goudreault, M. Sanches, S. Tate, B. Larsen, L. C. D. Gibson, W. B. Derry, I. C. Scott, L. Pelletier, G. S. Baillie, F. Sicheri and A.-C. Gingras (2011). "Structure-Function Analysis of Core STRIPAK Proteins: A SIGNALING COMPLEX IMPLICATED IN GOLGI POLARIZATION." Journal of Biological Chemistry **286**(28): 25065-25075.
- Krassak, M., K. Falk Petersen, A. Dresner, L. DiPietro, M. S. Vogel, L. D. Rothman, I. G. Shulman and M. Roden (1999). "Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a <sup>1</sup>H NMR spectroscopy study." Diabetologia **42**(1): 113-116.
- Kyriakis, J. M. (1999). "Signaling by the Germinal Center Kinase Family of Protein Kinases." Journal of Biological Chemistry **274**(9): 5259-5262.
- Leberer, E., D. Dignard, D. Harskus, D. Y. Thomas and M. Whiteway (1992). "The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein beta gamma subunits to downstream signalling components." The EMBO Journal **11**(13): 4815-4824.
- Lin, C. Y., H. Y. Wu, P. L. Wang and C. J. Yuan (2010). "Mammalian Ste20-like protein kinase 3 induces a caspase-independent apoptotic pathway." Int J Biochem Cell Biol **42**(1): 98-105.
- Lin, J. L., H. C. Chen, H. I. Fang, D. Robinson, H. J. Kung and H. M. Shih (2001). "MST4, a new Ste20-related kinase that mediates cell growth and transformation via modulating ERK pathway." Oncogene **20**(45): 6559-6569.
- Ling, P., T.-J. Lu, C.-J. Yuan and M.-D. Lai (2008). "Biosignaling of mammalian Ste20-related kinases." Cellular Signalling **20**(7): 1237-1247.
- Lochner, A. and J. A. Moolman (2006). "The Many Faces of H89: A Review." Cardiovascular Drug Reviews **24**(3-4): 261-274.
- Long, Y. C. and J. R. Zierath (2006). "AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation." Journal of Clinical Investigation **116**(7): 1776-1783.
- Ma, X., H. Zhao, J. Shan, F. Long, Y. Chen, Y. Chen, Y. Zhang, X. Han and D. Ma (2007). "PDCD10 Interacts with Ste20-related Kinase MST4 to Promote Cell Growth and

- Transformation via Modulation of the ERK Pathway." Molecular Biology of the Cell **18**(6): 1965-1978.
- Mackenzie, R. W. A. and B. T. Elliott (2014). "Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes." Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy **7**: 55-64.
- Manieri, E. and G. Sabio (2015). "Stress kinases in the modulation of metabolism and energy balance." Journal of Molecular Endocrinology **55**(2): R11-R22.
- Manser, E., T. Leung, H. Salihuddin, Z.-s. Zhao and L. Lim (1994). "A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1." Nature **367**(6458): 40-46.
- Marquez, J. G. (2012). "Tema 8: Gluconeogénesis y su regulación. ." Retrieved 19/07/2016, 2016, from <http://bioquimica2usc.blogspot.com.es/2013/05/tema-8-gluconeogenesis-y-su-regulacion.html?view=classic>.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher and R. C. Turner (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." Diabetologia **28**(7): 412-419.
- Medina-Gómez, G. L., Chris Vidal Puig, Antonio (2004). "Lipotoxicidad y Diabetes." INVESTIGACIÓN Y CIENCIA **336**: 58-65.
- Meigs, J. B., D. C. Muller, D. M. Nathan, D. R. Blake and R. Andres (2003). "The Natural History of Progression From Normal Glucose Tolerance to Type 2 Diabetes in the Baltimore Longitudinal Study of Aging." Diabetes **52**(6): 1475-1484.
- Mithieux, G., F. Rajas and A. Gautier-Stein (2004). "A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis." J Biol Chem **279**(43): 44231-44234.
- Moller, D. E. and K. D. Kaufman (2005). "Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective." Annu Rev Med **56**: 45-62.
- MONTAGUTELLI, X. (2000). "Effect of the Genetic Background on the Phenotype of Mouse Mutations." Journal of the American Society of Nephrology **11**(suppl 2): S101-S105.
- Nerstedt, A., E. Cansby, C. X. Andersson, M. Laakso, A. Stančáková, M. Blüher, U. Smith and M. Mahlapuu (2012). "Serine/threonine protein kinase 25 (STK25): a novel negative regulator of lipid and glucose metabolism in rodent and human skeletal muscle." Diabetologia **55**(6): 1797-1807.
- Nogueira, E., M. Fidalgo, A. Molnar, J. Kyriakis, T. Force, J. Zalvide and C. M. Pombo (2008). "SOK1 Translocates from the Golgi to the Nucleus upon Chemical Anoxia and Induces Apoptotic Cell Death." Journal of Biological Chemistry **283**(23): 16248-16258.
- Oh, K.-J., H.-S. Han, M.-J. Kim and S.-H. Koo (2013). "CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis." BMB Reports **46**(12): 567-574.



- Osada, S., M. Izawa, R. Saito, K. Mizuno, A. Suzuki, S. Hirai and S. Ohno (1997). "YSK1, a novel mammalian protein kinase structurally related to Ste20 and SPS1, but is not involved in the known MAPK pathways." Oncogene **14**(17): 2047-2057.
- Özcan, U., Q. Cao, E. Yilmaz, A.-H. Lee, N. N. Iwakoshi, E. Özdelen, G. Tuncman, C. Görgün, L. H. Glimcher and G. S. Hotamisligil (2004). "Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes." Science **306**(5695): 457-461.
- Pilkis, S. J., M. R. el-Maghrabi and T. H. Claus (1988). "Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis." Annu Rev Biochem **57**: 755-783.
- Pombo, C. M., J. V. Bonventre, A. Molnar, J. Kyriakis and T. Force (1996). "Activation of a human Ste20-like kinase by oxidant stress defines a novel stress response pathway." The EMBO Journal **15**(17): 4537-4546.
- Pombo, C. M., T. Force, J. Kyriakis, E. Nogueira, M. Fidalgo and J. Zalvide (2007). "The GCK II and III subfamilies of the STE20 group kinases." Front Biosci **12**: 850-859.
- Powell, D. J., E. Hajdich, G. Kular and H. S. Hundal (2003). "Ceramide Disables 3-Phosphoinositide Binding to the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B (PKB)/Akt by a PKC $\zeta$ -Dependent Mechanism." Molecular and Cellular Biology **23**(21): 7794-7808.
- Powers, A. C. (2016). Diabetes mellitus: diagnóstico, clasificación y fisiopatología. Harrison. Principios de Medicina Interna, 19e. D. Kasper, A. Fauci, S. Hauser et al. New York, NY, McGraw-Hill Education.
- Preisinger, C., B. Short, V. De Corte, E. Bruyneel, A. Haas, R. Kopajtich, J. Gettemans and F. A. Barr (2004). "YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3zeta." J Cell Biol **164**(7): 1009-1020.
- Puigserver, P., J. Rhee, J. Donovan, C. J. Walkey, J. C. Yoon, F. Oriente, Y. Kitamura, J. Altomonte, H. Dong, D. Accili and B. M. Spiegelman (2003). "Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1[alpha] interaction." Nature **423**(6939): 550-555.
- Puigserver, P., J. Rhee, J. Lin, Z. Wu, J. C. Yoon, C.-Y. Zhang, S. Krauss, V. K. Mootha, B. B. Lowell and B. M. Spiegelman (2001). "Cytokine Stimulation of Energy Expenditure through p38 MAP Kinase Activation of PPAR $\gamma$  Coactivator-1." Molecular Cell **8**(5): 971-982.
- Qian, Z., C. Lin, R. Espinosa, M. LeBeau and M. R. Rosner (2001). "Cloning and characterization of MST4, a novel Ste20-like kinase." J Biol Chem **276**(25): 22439-22445.
- Raddatz, D. and G. Ramadori (2007). "Carbohydrate Metabolism and the Liver: Actual Aspects from Physiology and Disease." Z Gastroenterol **45**(01): 51-62.
- Radu, M. and J. Chernoff (2009). "The DeMSTification of Mammalian Ste20 Kinases." Current Biology **19**(10): R421-R425.

- Ramadoss, P., N. E. Unger-Smith, F. S. Lam and A. N. Hollenberg (2009). "STAT3 Targets the Regulatory Regions of Gluconeogenic Genes in Vivo." Molecular Endocrinology **23**(6): 827-837.
- Randle, P. J., P. B. Garland, C. N. Hales and E. A. Newsholme (1963). "Originally published as Volume 1, Issue 7285 THE GLUCOSE FATTY-ACID CYCLE ITS ROLE IN INSULIN SENSITIVITY AND THE METABOLIC DISTURBANCES OF DIABETES MELLITUS." The Lancet **281**(7285): 785-789.
- Ress, C. and S. Kaser (2016). "Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation." World J Gastroenterol **22**(4): 1664-1673.
- Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2006). "Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis." Nature **444**(7121): 847-853.
- Ruiz-Alcaraz, A. J., C. Lipina, J. R. Petrie, M. J. Murphy, A. D. Morris, C. Sutherland and D. J. Cuthbertson (2013). "Obesity-Induced Insulin Resistance in Human Skeletal Muscle Is Characterised by Defective Activation of p42/p44 MAP Kinase." PLoS ONE **8**(2): e56928.
- Sabio, G., J. Cavanagh-Kyros, H. J. Ko, D. Y. Jung, S. Gray, J. Y. Jun, T. Barrett, A. Mora, J. K. Kim and R. J. Davis (2009). "Prevention of Steatosis by Hepatic JNK1." Cell metabolism **10**(6): 491-498.
- Sabio, G., M. Das, A. Mora, Z. Zhang, J. Y. Jun, H. J. Ko, T. Barrett, J. K. Kim and R. J. Davis (2008). "A Stress Signaling Pathway in Adipose Tissue Regulates Hepatic Insulin Resistance." Science (New York, N.Y.) **322**(5907): 1539-1543.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning, Cold spring harbor laboratory press New York.
- Samuel, Varman T. and Gerald I. Shulman (2012). "Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links." Cell **148**(5): 852-871.
- Sanderson, L. M., T. Degenhardt, A. Koppen, E. Kalkhoven, B. Desvergne, M. Müller and S. Kersten (2009). "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\beta/\delta$  (PPAR $\beta/\delta$ ) but Not PPAR $\alpha$  Serves as a Plasma Free Fatty Acid Sensor in Liver." Molecular and Cellular Biology **29**(23): 6257-6267.
- Schinkmann, K. and J. Blenis (1997). "Cloning and characterization of a human STE20-like protein kinase with unusual cofactor requirements." J Biol Chem **272**(45): 28695-28703.
- Semple, R. K., A. Sleight, P. R. Murgatroyd, C. A. Adams, L. Bluck, S. Jackson, A. Vottero, D. Kanabar, V. Charlton-menys, P. Durrington, M. A. Soos, T. A. Carpenter, D. J. Lomas, E. K. Cochran, P. Gorden, S. O. Rahilly and D. B. Savage (2009). "Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis." **119**(2).
- Solomon, K. R., M. A. Mallory and R. W. Finberg (1998). "Determination of the non-ionic detergent insolubility and phosphoprotein associations of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins expressed on T cells." Biochemical Journal **334**(Pt 2): 325-333.



- Stanford, W. L., J. B. Cohn and S. P. Cordes (2001). "Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond." Nat Rev Genet **2**(10): 756-768.
- Storlien, L. H., A. B. Jenkins, D. J. Chisholm, W. S. Pascoe, S. Khouri and E. W. Kraegen (1991). "Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid." Diabetes **40**(2): 280-289.
- Sugden, Peter H., Liam J. McGuffin and A. Clerk (2013). "SOcK, MiSTs, MASK and STicKs: the GCKIII (germinal centre kinase III) kinases and their heterologous protein–protein interactions." Biochemical Journal **454**(1): 13-30.
- Tangvarasittichai, S. (2015). "Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus." World Journal of Diabetes **6**(3): 456-480.
- Taniguchi, C. M., B. Emanuelli and C. R. Kahn (2006). "Critical nodes in signalling pathways : insights into insulin action." **7**(February): 85-96.
- ten Klooster, J. P., M. Jansen, J. Yuan, V. Oorschot, H. Begthel, V. Di Giacomo, F. Colland, J. de Koning, M. M. Maurice, P. Hornbeck and H. Clevers (2009). "Mst4 and Ezrin induce brush borders downstream of the Lkb1/Strad/Mo25 polarization complex." Dev Cell **16**(4): 551-562.
- Teruel, T., R. Hernandez and M. Lorenzo (2001). "Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state." Diabetes **50**(11): 2563-2571.
- Thompson, B. J. and E. Sahai (2015). "MST kinases in development and disease." The Journal of Cell Biology **210**(6): 871-882.
- Toker, A. and S. Marmiroli (2014). "Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease." Advances in Biological Regulation **55**: 28-38.
- Tong, Y., Y. Lin, Y. Zhang, J. Yang, Y. Zhang, H. Liu and B. Zhang (2009). "Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis." BMC Medical Genetics **10**: 15-15.
- Wahren, J. and K. Ekberg (2007). "Splanchnic regulation of glucose production." Annu Rev Nutr **27**: 329-345.
- Wellen, K. E. and G. S. Hotamisligil (2003). "Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue." Journal of Clinical Investigation **112**(12): 1785-1788.
- Wellen, K. E. and G. S. Hotamisligil (2005). "Inflammation, stress, and diabetes." Journal of Clinical Investigation **115**(5): 1111-1119.

- Wigler, M., R. Sweet, G. K. Sim, B. Wold, A. Pellicer, E. Lacy, T. Maniatis, S. Silverstein and R. Axel (1979). "Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes." Cell **16**(4): 777-785.
- Winzell, M. S. and B. Ahrén (2004). "The High-Fat Diet–Fed Mouse: A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes." Diabetes **53**(suppl 3): S215-S219.
- Wondisford, A. R., L. Xiong, E. Chang, S. Meng, D. J. Meyers, M. Li, P. A. Cole and L. He (2014). "Control of Foxo1 Gene Expression by Co-activator P300." The Journal of Biological Chemistry **289**(7): 4326-4333.
- Wu, C., M. Whiteway, D. Y. Thomas and E. Leberer (1995). "Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase from *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **270**(27): 15984-15992.
- Wu, H. Y., C. Y. Lin, T. C. Chen, S. T. Pan and C. J. Yuan (2011). "Mammalian Ste20-like protein kinase 3 plays a role in hypoxia-induced apoptosis of trophoblast cell line 3A-sub-E." Int J Biochem Cell Biol **43**(5): 742-750.
- Wu, H. Y., C. Y. Lin, T. Y. Lin, T. C. Chen and C. J. Yuan (2008). "Mammalian Ste20-like protein kinase 3 mediates trophoblast apoptosis in spontaneous delivery." Apoptosis **13**(2): 283-294.
- Xu, H., G. T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C. J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J. S. Ross, L. A. Tartaglia and H. Chen (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." Journal of Clinical Investigation **112**(12): 1821-1830.
- Yang, H., X. Jin, C. W. Kei Lam and S. K. Yan (2011). "Oxidative stress and diabetes mellitus." Clin Chem Lab Med **49**(11): 1773-1782.
- Zhang, H., X. Ma, X. Deng, Y. Chen, X. Mo, Y. Zhang, H. Zhao and D. Ma (2012). "PDCD10 interacts with STK25 to accelerate cell apoptosis under oxidative stress." Front Biosci (Landmark Ed) **17**: 2295-2305.
- Zhou, T. H., K. Ling, J. Guo, H. Zhou, Y. L. Wu, Q. Jing, L. Ma and G. Pei (2000). "Identification of a human brain-specific isoform of mammalian STE20-like kinase 3 that is regulated by cAMP-dependent protein kinase." J Biol Chem **275**(4): 2513-2519.



## AGRADECEMENTOS

Toca pechar unha etapa. Resulta duro chegar á fin dun ciclo onde cada día había un oxectivo a perseguir, una meta que acadar. Agora atópome na meta que é este manuscrito e vexo que en realidade é moito mais ca un feixe de papeis, é una mistura de experiencias e emocións tanto positivas coma negativas. Á mente veñenme centos de recordos, todas as dificultades e as decepcións, o traballo duro e a perseverancia que este mundo da ciencia esixe, pero tamén a reflexión de que todo ese esforzo foi guiado por una especie de “devoción” ó que facemos, ás ganas de descubrir o por que das cousas e o como funciona a nosa maquinaria mais agochada. ¡Sen dúbida isto ten algo que engancha!. Pero sobre todo, o medo que máis me invade de pechar esta andaina é o de dicirles ata logo (e non digo adeus) a toda a xente que me atopei durante esta etapa de tesis tanto en Fisioloxía coma no CIMUS así como tamén os que coñecín fóra. A todos eles lles quero agradecer que se subisen comigo na montaña rusa emocional que supón facer a tese e que contribuíron a que este día chegase.

En primeiro lugar agradecer ós meus directores de tese, Celia e Chito. A Celia por confiar en min e abríreme as portas do seu laboratorio e facerme ver as realidades do mundo da ciencia, e a Chito polo seu carácter amable e por estar sempre dispoñible para solucionar calqueira dúbida e incluso poñer a bata para botar unha man cos experimentos. Tamén a Sulay (coa que tiven a sorte de compartir POD) e a Rubén que nos aconsellaron en numerosas ocasións nunha área que descoñecíamos por completo e porque sempre puxeron a nosa disposición todos os seus medios.

Os meus compis de labo, empezando polos primeiros que me atopei e dos que puideron aprender moito e me diron bos consellos, Miguel, María e Ana. Un agradecemento especial a Ebel, polas súas toleadas e porque coa súa filosofía de vida me fixo rir e me ensinou a relativizar. A todos os patitos que viñeron a aprender con nós e dos que tamén se acaba aprendendo cousas e que ademáis me demostraron todo o seu cariño, en especial a Álex, Diana, Marquiños e Fátima, Mari Tari.... Ás novas adquisicións Yara e Parda que tamén fixeron estes meses de escritura moi levadeiros. A Mariajo e Miguel por ser un exemplo de perseverancia e fortaleza.

Gracias a Anxo e Carmen, pola axuda en numerosas ocasións e a ós seus doctorandos, Erea, Atenea, Fer e Lore, tamén a Vane e en especial a Gloria (eres todo un descubrimento!) e moi especialmente a Esther porque me escoitou, apoiou e acompañou en miles de ocasións e convertiuse nunha imprescindible. A Pati polos seus incansables ánimos.

Ós POL4, moitas gracias pola vosa axuda e consellos especialmente a Bego (canto e en cantos ámbitos me axudaches, para min o toxo e a flor mais bonita de Galicia!!) E a Mónica

polos sermóns merecidos e sabios consellos. A Cintia por tantas e agradables camiñatas acompañándome ó CIMUS. As chicas coas que compartín o tempo de comida na resting area, especialmente a Pati Pazos e as chicas de Clara.

Ás veciñas do POL5, Irene e Cristi, por compartir tardes de loucura, música e baile. Tamén a Raquel por aparecer sempre con un sorriso.

A todos e cada un dos meus topolinos que perderon a vida pola causa, que fixeron que me reconciliara coa miña alma de bióloga de bota frustrada e me ensinaron que amar ós animais e facer ciencia con eles non é incompatible e porque poñerlles nome tampouco é tan malo como din... *"Happy animals make good science"*. E a Aniña por coidarmos tan ben, e por ser unha das persoas mais doces que coñezo...

E xa fora do CIMUS, tampouco podo deixar de mencionar ó meu grupo de amigos da infancia (OS 15 2 B CORTIZOS DE ABAIXO), gracias pola paciencia de tantas ausencias, por Pedro, por entendela e apoiarme tanto. Sodes do mellor, sempre unidos! Iría un por un, pero sería interminable e xa o saben todo. As amigas da infancia, en especial á incondicional Laura coa que sempre podo contar, a Silvia, Vane e María, inesquecibles. Gracias a Xan, por estar sempre pendente e polas súas paíasadas.

A Violeta, Noa e Olalla amigas da carreira que serán amigas sempre e que estiveron ó meu carón aínda que non fose no día a día ou fose dende a distancia. Igual que Ana e Alba, Thais...

A Miki e Mariña pola boa convivencia nestes anos de tese. A Diego por ser tan repelente como adorable, único, pero que se fai ben de querer.

Os meus colegas cos que comparto afición polo baile, porque foi dos mellores descubrimentos que acompañaron á tese e cos que formei un marabilloso grupo, sobretudo a Marti, Andrew, Naty, e especialmente a Marcos que se convertiu nun grande amigo e bailarín e novamente a Esther que tamén ter que vir aquí. Espero mantervos para sempre igual que esta afección.

Por último e mais importante, a toda a miña familia que son o motor do meu día a día, a meus pais que me ensinaron a ser quen son e sempre se mostraron orgullosos de min (Mamá sinto todo o que te preocupe), a meu irmán por ser a mellor persoa do mundo, a miña prima e anxiño da garda Silvia que me coida sempre sen esperar nada a cambio, ti@s e prim@s. Finalmente a miñas avoas por demostrarme tanto e polo esforzo que fixeron por entender que coidar ratos era un traballo de verdade. A Osa e Pepe que a súa maneira axudaron moito nesta tese.

Ah!!! Non podo esquecerme de agradecerlle á Xunta de Galicia que me dise de comer durante tres anos para que isto fose mais doado. Tamén a todos aqueles que se me quedaron no tinteiro.

